DIE ELIMINIERUNG VON PLASMIDEN DURCH DAS DIAZABORIN CG 3401

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

Reinhart Böffel
aus Duisburg

Bonn 1980

DIE ELIMINIERUNG VON PLASMIDEN DURCH DAS DIAZABORIN CG 3401

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

Reinhart Böffel
aus Duisburg

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Wiedemann

2. Gutachter: Prof. Dr. K. E. Schneweis

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. H. Brandis
Abteilung Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten
Leiter: Prof. Dr. B. Wiedemann

Druck: K. Brinkmann, Duisburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	8
2.2	Verwendete Nährmedien	9
2.3	Verwendete Substanzen und Antibiotika	10
2.4	Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	12
2.5	Methode zur Bestimmung der Keimzahl	13
2.6	Züchtung von Diazaborin (=Dz) - resistenten Mutanten	13
2.7	Methode zur Eliminierung von Plasmiden	14
2.8	Replika-Technik	16
2.9	Methode zur Übertragung von R-Plasmiden (Konjugation)	18
3.	Eigene Ergebnisse	19
3.1	Wirkung von Diazaborin auf das Wachstum von Bakterienpopulationen des E.coli W 3110-Stammes	19
3.2	Wirkung von Diazaborin auf Plasmid-tragende und Plasmid-lose E.coli W 3110-Stämme	21
3.3	F-Faktor-Eliminierung durch Acridin Orange	22
3.4	F-Faktor-Eliminierung durch Diazaborin	22
3.5	R-Faktor-Eliminierung durch Diazaborin	30
3.6	Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von E.coli W 3110-Stämmen nach Eliminierung von Plasmiden mit Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenz	41
4.	Diskussion (Schlußfolgerung)	42
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	54

1. Einleitung

Ein großes Problem der modernen Chemotherapie besteht in der Resistenzentwicklung von ursprünglich Antibiotika-sensiblen Bakterienstämmen. In dem Lehrbuch von JAWETZ, MELNICK und ADELBERG (17) findet man folgende Angaben: resistente Mutanten können durch drei verschiedene Mechanismen entstehen:

1. durch Mutationen, die mit einer Häufigkeit von $1:10^5$ bis $1:10^9$ entstehen,

2. durch Rekombinationen und

3. durch den Erwerb zusätzlicher genetischer, extrachromosomaler Information, sogenannter Plasmide.

Plasmide sind nach FALKOW, CITARELLA, WOHLHIETER und WATANABE (7) zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle mit Molekulargewichten von $0{,}4 - 8 \times 10^7$. Sie stellen unabhängige Einheiten der Replikation, sog. Replicons, dar, sind aber nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Bakterienzellen.
Man unterscheidet nach JAWETZ, MELNICK und ADELBERG (17) Plasmide mit unterschiedlichen Eigenschaften:

1. Die F-Plasmide (F-Faktoren): Sie vermitteln die Übertragung von genetischer Information, indem sie über den Sex-Pilus, einen besonderen Proteinfaden, den die Bakterienzelle hervortreibt und der durch Plasmidgene kodiert wird, neu synthetisierte DNA von F^+-Donor-Zellen auf F^--Rezipienten-Zellen transferieren.

2. Die R-Plasmide (R-Faktoren): Diese tragen Gene, die der Wirtszelle Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika vermitteln. Der größte Teil dieser Resistenz-Plasmide ist laut WIEDEMANN (32) mit Funktionen belegt, die für die Infektiosität bzw. die Übertragung der Infektiosität notwendig sind; es handelt sich um den sog. Resistenz-Transfer-Faktor (RTF). Der kleinere Teil ist mit Resistenzeigenschaften in Form der sogenannten

Resistenz-Determinanten besetzt, die zu Schwierigkeiten in der Chemotherapie führen. Der Anstieg der Antibiotika-Resistenz wird hauptsächlich durch Bakterien mit Resistenz-Plasmiden hervorgerufen. Dies begründet Wiedemann (32) mit der Überlegenheit der extrachromosomalen Resistenz gegenüber der durch Mutation erworbenen chromosomalen Resistenz, weil chromosomalresistente Bakterienmutanten durch Veränderung ihres Genoms Virulenzverluste gegenüber ihren resistenten Elternzellen aufweisen und weniger lebensfähig seien. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, einen weiteren Resistenz-Anstieg zu verhindern oder sogar rückgängig zu machen:

1. Durch sparsame und gezielte Anwendung von Chemotherapeutika nach Anlegen von Antibiogrammen.

2. Durch 'Heilung' der Bakterien von ihren Resistenzeigenschaften und damit von ihren Plasmiden mit Hilfe verschiedener Substanzen, sog. 'Plasmid-curing', wie FALKOW (6) formuliert. Das 'Plasmid-curing' ist identisch mit dem Begriff der Plasmid-Eliminierung, was zunächst phaenomenologisch als ein Verlust der phaenotypischen Eigenschaft angesehen wurde. FALKOW (6) gibt folgendes Beispiel: "Untersucht man den Effekt einer Substanz auf die Eliminierung von F'lac$^+$ oder eines R-Faktors, so bedeutet das Nichterscheinen der Eigenschaft lac$^+$ oder der Antibiotika-Resistenz (kein Wachstum auf Antibiotika-haltigem Agar) eine Eliminierung der Eigenschaft lac$^+$ oder der Resistenz".

In der Literatur sind sowohl F- als auch R-Plasmid-Eliminierungen durch verschiedene Substanzen beschrieben. 1957 entdeckten HIROTA und ILJIMA (16), daß Aminoakridine und insbesondere das Acriflavin das F'lac$^+$- Plasmid von E.coli K 12 W 3110 in fast 100 % der Fälle zerstören konnten.
HIROTA (15) verlangte dabei gleichzeitig die Einhaltung folgender Kautelen für Eliminierungsversuche von F'lac$^+$ durch Acridine:

1. Enge pH-Aktivitätsgrenzen, die in Relation zu den Dissoziationskonstanten der Aminoakridine stehen

2. Geringe Bakterieninokulation von weniger als 10^4 Zellen/ml

3. Organische Wachstumsmedien mit verschiedenen definierten Aminosäuren

4. Wachstumsperiode von mehr als 6 Stunden

5. Physiologische Inkubationstemperatur von 37°C zur Unterstützung eines ausreichenden bakteriellen Wachstums

1961 berichteten WATANABE und FUKASAWA (28), daß Acriflavin und Acridin Orange neben F-Plasmiden auch bestimmte Resistenz-Determinanten von R-Faktoren eliminierten.

1969 veröffentlichten BOUANCHAUD, SCAVIZZI und CHABBERT (1), daß Ethidium Bromid die lac^+-Eigenschaft von $F'lac^+$ auf E.coli und bestimmte Resistenzeigenschaften von R-Faktoren auf verschiedenen Wirtsbakterien zerstörte.
Diese Ergebnisse wurden 1971 von HAHN und CIAK (11) bestätigt, die vergleichend die Wirkung von Quinacrin, Ethidium Bromid, Acridin Orange, Chloroquin, Miracil D, Berberin, Spermin, p-Rosanilin und Methylen-Blau auf die F- und R-Faktor-Elimination untersuchten und dabei eine sog. $\underline{ED_{50}}$, eine 50%-ige Eliminierungsdosis postulierten: Hierunter verstehen sie diejenige Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50 % der ausgetesteten Keime ihr Plasmid durch die Behandlung mit den entsprechenden Substanzen verloren hatten.

HAHN (10) gibt zwei verschiedene Möglichkeiten der Plasmid-Eliminierung an:

1. <u>Die Eliminierung von Resistenz-Determinanten</u> der R-Faktoren durch verschiedene Substanzen, wie:

Akridine (WATANABE, FUKASAWA (28, 29, 30) und MITSUHASHI, HARADA und KAMEDA (21))

Nitroakridine, Quinacrin, Ethidium Bromid, Acridin Orange, Chloroquin, Miracil D, Berberin, Spermin, p-Rosanilin und Methylen-Blau (HAHN, CIAK (11))

Anionische Detergentien, zum Beispiel SDS (TOMOEDA, INUZUKA, KUBO, NAKAMURA (27))

Rifampicin (JOHNSTON, RICHMOND (18))

Nalidixinsäure (HAHN, CIAK (12))

Trimethoprim (PINNEY, SMITH (22))

2. Die Hemmung der R-Faktor-Übertragung

Hierbei gibt es wiederum 2 Alternativen:

a) Die indirekte Hemmung der F-Faktor-Übertragung mit Eliminierung der Resistenz-Determinanten

(Plasmidreplikationshemmung) durch
Aminoakridine (HAYASHI, KODAIRA, OGAWA, BABA, KIKUCHI (14))
und Nitrofurantoin (SHENDEROV (25))

b) Die direkte Hemmung der F-Faktor-Übertragung ohne Eliminierung von Resistenz-Determinanten

durch 9,3 - Dimethylaminopropyliden-fluoren-HCL
(DULANEY, RUBY (4))
Distamycin A (HAHN (9), SANFILIPPO (24))
und Levallorphan (LÖSER, BOQUET, RAAB, RÖSCHENTHALER (20, 23))

Man muß sich darüber im klaren sein, daß der Begriff 'Plasmid-Eliminierung' nur ein Phänomen beschreibt, aber nichts über den Wirkungsmechanismus aussagt. FRANKLIN und SNOW (8) sprechen in diesem Sinne von einer meist irreversiblen Nucleinsäuresynthesehemmung, die zu einem Funktionsverlust des betreffenden Plasmids (das ja aus DNA besteht) führen soll. Diese Nucleinsäuresynthesehemmung ist nach Meinung der Autoren durch 2 verschiedene

Mechanismen möglich:

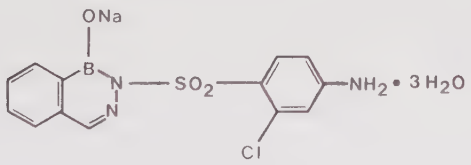
1. Zerstörung der Matrizenfunktion der Nucleinsäure durch Interaktion von Substanzen mit der Nucleinsäure.

2. Direkte Hemmung der spezifischen Polymerase infolge einer Interferenz zwischen Inhibitor und Matrizenmolekül, die zu tiefgreifenden Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Makromoleküls führt.

FRANKLIN und SNOW (8) charakterisieren diese Nucleinsäuresynthesehemmung anhand der Substanzen Aktinomycin D und der Akridine. Das vor 30 Jahren entdeckte antibiotische Zytostatikum. Aktinomycin D besitzt die Fähigkeit, die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Assoziation mit der doppelsträngigen DNA zu hemmen und führt zu ganz charakteristischen Änderungen der physikalischen Eigenschaften der Nucleinsäuren. Die Interaktion der Acridine und Phenantridine mit der DNA stellt den Prototyp für den Mechanismus der Intercalierung (Einlagerung) dar, den LERMAN (19) im Jahre 1964 erforscht hatte:
Danach können sich flache, geschlossene heterozyklische aromatische Ringsysteme in die aufeinanderliegenden Basenpaare in der Doppelhelix-Struktur der DNA einlagern. Die Zwischenräume für eine Intercalierung werden durch lokales Entknäueln (Untwisting) der DNA-Doppelhelix von ungefähr 12 ^{o} frei, wodurch die vorher eng benachbarten Basenpaare ohne Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen um circa 3,5 Å voneinander getrennt werden (CAIRNS (2)). Die Stabilisierung der Intercalierungsbindungen läßt sich demnach durch eine elektrostatische Anziehung zwischen den geschlossenen Ringsystemen der intercalierenden Substanz und den Phosphatgruppen der heterozyklischen Basenpaare erklären. Durch die vielfache Einlagerung solcher intercalierenden Substanzen in das DNA-Ringmolekül von Plasmiden wird die normal gedrehte zirkuläre Plasmid-DNA in eine unnatürlich gedrehte Form überführt und in dieser Form fixiert und eine Replikation der Plasmid-DNA verhindert (Hypothese von HAHN und CIAK (11,12)). Somit läßt sich dann der Verlust von

F- oder R-Plasmiden als eine Plasmid-DNA-Synthese- bzw. -Replikationshemmung erklären. Diese funktionelle Inaktivierung kann man nach HAHN (10) nachweisen, indem man entweder Resistenz-Determinanten von R-Faktoren eliminiert oder die R-Faktor-Übertragung mit und ohne Eliminierung der R-Determinanten hemmt. Die meisten Pharmaka, wie zum Beispiel die intercalierenden Substanzen, hemmen die Plasmid-Replikation und sind auch gleichzeitig Übertragungshemmer. Die wenigen spezifischen Übertragungshemmer wirken auf die Bakterienoberfläche und verhindern die Formation von Paarungen.

HAHN's (10) Therapievorschlag sieht deshalb folgendermaßen aus: Entweder man findet Pharmaka, die sowohl antibakteriell als auch Plasmid-eliminierend als sog. 'Breitspektruminhibitoren' wirken, oder man wendet eine Kombination aus R-Plasmid-eliminierenden Substanzen und Chemotherapeutika an, um die Antibiotikasensibilität der Tochterzellen von resistenten Bakterienstämmen wiederherzustellen, so daß das gleichzeitig verabreichte antibakteriell wirksame Präparat nun alle sensibel gewordenen Keime abtöten kann. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung des Diazaborins CG 3401 in Bezug auf die Eliminierungsmöglichkeiten von F- und R-Plasmiden zu untersuchen. Bei der Substanz CG 3401 handelt es sich laut Mitteilung des Herstellers (Chemie Grünenthal GmbH (3)) um das Trihydrat der Natriumverbindung des 1-Hydroxy-2-(2'-Chlor-4'-aminophenylsulfonyl)-benzo-2,3,1-diazaborins mit folgender Strukturformel:



Das Diazaborin CG 3401 wird laut Hersteller (Chemie Grünenthal GmbH (3)) als ein wirksames bakteriostatisches Harnwegstherapeutikum gegen Infektionen mit gramnegativen Erregern mit Ausnahme von Pseudomonas aeruginosa angesehen; es besitzt jedoch keine Wirkung auf grampositive Mikroorganismen, wie zum Beispiel Staphylococcus aureus. Da der genaue Wirkungsmechanismus dieser Substanz unbekannt ist, kann man auch nicht behaupten, daß sie intercalierend wirkt.

Das Präparat CG 3401 könnte vielleicht nach dem Vorschlag von HAHN (10) ein Breitspektruminhibitor darstellen, also sowohl Plasmid-eliminierend als auch bakteriostatisch wirken.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Bezeichnung der Stämme	chromosomaler Marker	Bezeichnung des Plasmids	Plasmid-Marker	Herkunft
E.coli K12W3110	$NA^s;Rif^s;lac^+$			
E.coli K12W3110	$Rif^r;lac^-$	$F'lac^+$	lac^+	
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^-$	$F'lac^+$	lac^+	
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^+$	RA 1	$Su^r;Tc^r$	
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^+$	R S-a	$Cm^r;Km^r;Sm^r;Su^r$	
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^+$	R1767	$Ap^r;Cm^r;Sm^r;Tc^r$; Col I, tra^+	Transkonjugant
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^+$	R1767	$Ap^r;tra^-$	Transkonjugant
E.coli K12W3110	$NA^r;lac^-$	R 100	$Sm^r;Su^r;Tc^r$	
E.coli C 600	$Sm^r;lac^-$	R1767	$Ap^r;tra^-$	Transformant
S.typhimurium	$NA^s;lac^-$	R1767	Ap^r; Cm^r; Sm^r; Tc^r; Col I; tra^+	

Abkürzungen der Antibiotika siehe unter 2.3.16, S. 12

lac^+, lac^- = Laktose positiv bzw. negativ

tra^+, tra^- = Transfer positiv bzw. negativ

2.2 Verwendete Nährmedien

2.2.1 Chinablau-Lactose-Agar (CL-Agar)

(Merck Art-Nr. 2348)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Fleischextract	3,0
Pepton aus Casein	5,0
Lactose	10,0
Chinablau	0,375
Natriumchlorid	5,0
Agar-Agar	12,0

Bereitung

35 g werden in einem Liter Aqua dest. oder Aqua dem. suspendiert, 15 Minuten eingeweicht und bis zum vollständigen Auflösen im Dampftopf gekocht. Anschließend 20 Minuten Sterilisation im Autoklaven bei 121°C und 1 atm. pH-Wert-Einstellung auf 7,2.
Bei Bedarf Antibiotika-Zusatz nach Abkühlen auf 60°C.

2.2.2 Standard I-Nutrient-Agar (NI-Agar)

(Merck Art-Nr. 7881)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Spezialpepton	15,6
Hefeextrakt	2,8
Natriumchlorid	5,6
D (+) - Glucose	1,0
Agar-Agar	12,0

Suspension von 37 g in einem Liter Wasser. Nach Verflüssigung im Dampftopf 20-minütige Sterilisation im Autoklaven bei 121°C mit 1 atm. Druck.
Einstellung auf den pH von 7,4 - 7,6.
Bei Bedarf Antibiotikazusatz nach Abkühlung auf 60°C.

2.2.3 Standard I-Nutrient Bouillon (NI-Bouillon)

(Merck Art-Nr. 7882)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Spezialpepton	15,6
Hefeextrakt	2,8
Natriumchlorid	5,6
D (+) - Clucose	1,0

Lösung von 25 g in 1 Liter Aqua dest. oder Aqua dem. Sterilisation im Autoklaven 20 Minuten bei 121°C und 1 atm. pH-Wert-Einstellung auf pH 7,4 - 7,6.

2.2.4 Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon)

(BBL = Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, manufactured in USA)

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Rindfleischinfusion	3,0
Acidicase TM Pepton	17,5
Stärke	1,5

pH: 7,2 - 7,6.

Bereitung

22 g des Pulvers werden in 1 Liter Aqua dest. gelöst. Nach Abfüllen in Röhrchen zu je 1 ml erfolgt die 20-minütige Sterilisation im Autoklaven bei 121°C und 1,1 atm.

2.3 Verwendete Substanzen und Antibiotika

2.3.1 70%-iger Alkohol im Verh. 1:10 mit Aqua dest. (zum Lösen von 2.3.7)

2.3.2 Dimethylsufoxid (DMSO) (zur Synthese; Merck Schuchhardt, Hohenbrunn Nr. 802912) (zum Lösen von (Rif) 2.3.11) (16 mg Rif/1 ml (DMSO))

2.3.3 Physiologische Kochsalzlösung (0,9 g NaC1/1)
(zum Lösen von 2.3.6; 2.3.10; 2.3.13)

2.3.4 0,1 normale NaOH (zum Lösen von 2.3.14)
(Merck Darmstadt)

2.3.5 Tris-Puffer (zum Lösen von 2.3.11 (NA) im Verh. 1:10)
(Tris(hydroxymethyl-)aminomethan, Merck Darmstadt Nr. 8387)
(2 mg NA + 20 mg Tris/1 ml H_2O)

2.3.6 Acridin Orange (Merck Darmstadt Nr. 1333)

2.3.7 Ampicillin (Amblosin ^{R}, Hoechst AG, Frankfurt/Main, Reg. No. 1384)

2.3.8 Chloramphenicol (Boehringer Mannheim, Charge No. 414246)

2.3.9 Diazaborin CG 3401 (Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg/Rheinland, Chargen-No. 101/2)

2.3.10 Kanamycin als Kanamycinmanosulfat (ber. auf Base)
(Chemie Grünenthal GmbH, Charge 5)

2.3.11 Nalidixinsäure (Winthrop Laboratories Ltd. DEV 903)

2.3.12 Rifampicin Reinsubstanz (Grünenthal Chemie GmbH, Chargen-No. 31)

2.3.13 Streptomycin als Streptomycinsulfat (Op. H 306)

2.3.14 Sulfonamid (Gantanol ^{R} Substanz, Hoffmann La Roche, Op. 183771)

2.3.15 Tetrazyklin (als Hostacylin ^{R} Hoechst, Op.-Nr. 51)

2.3.16 Die unter 2.3.5 - 2.3.14 aufgeführten Chemotherapeutika wurden dem Chinablau-Lactose-Agar bei 60°C in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	(= Ap)	:	20 µg/ml
Chloramphenicol	(= Cm)	:	20 µg/ml
Diazaborin	(= Dz)	:	20 µg/ml
Kanamycin	(= Km)	:	10 µg/ml
Nalidixinsäure	(= NA)	:	20 µg/ml
Rifampicin	(= Rif)	:	100 µg/ml
Streptomycin	(= Sm)	:	10 µg/ml
Sulfonamid	(= Su)	:	200 µg/ml
Tetrazyklin	(= Tc)	:	10 µg/ml

2.4 Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Von den zu testenden gelösten Substanzen wurden Verdünnungsreihen mit jeweils 1 ml Müller-Hinton-Bouillon in jedem Glasröhrchen als Inhalt hergestellt, so daß sich folgende Lösungskonzentrationen ergaben: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0,25 µg/ml. Ein Röhrchen enthielt dabei nur 1 ml Müller-Hinton-Bouillon ohne Substanz als Kontrolle.

1 - 2 Einzelkolonien der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in sterile Müller-Hinton-Bouillon eingeimpft.

Anschließend erfolgte die 4-5-stündige Bebrütung der beimpften Bouillon im schüttelnden Wasserbad bei 37°C, so daß eine ausreichend hohe Keimzahl von mindestens 10^7 Zellen/ml resultierte.

Nach Verdünnung der bebrüteten Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1000 in physiologischer Kochsalz-Lösung wurden die verdünnten Substanzlösungen mit einem Trop-

fen Bakteriensuspension aus der 1 ml-Pipette (= 0,025 ml) beimpft. Diese beimpften Bouillonröhrchen wurden über Nacht (ca. 18 Stunden) bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

Nun konnte anhand des Vergleiches der bebrüteten Röhrchen mit dem Kontrollröhrchen festgestellt werden, bei welcher Konzentration gerade kein Wachstum der Keime mehr auftrat, bzw. keine Trübung mehr zu erkennen war. Diese Konzentration entsprach dann der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der getesteten Substanz gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen.

2.5 Methode zur Bestimmung der Keimzahl

Die zu untersuchende gewachsene Bouillon-Kultur wurde zur Keimzahlbestimmung 1:10 bis zu $1:10^6$ mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Von diesen Verdünnungen wurde jeweils 0,1 ml auf getrockneten Chinablau-Lactose-Agar-Platten in verschiedenen Konzentrationen mit sterilen Glasspateln ausgespatelt.

Nach 24-stündiger statischer Bebrütung bei 37°C erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien und die Berechnung der Keimzahl/ml.

2.6 Herstellung einer Diazaborin-resistenten Kultur von E.coli W 3110 (Züchtung von Diazaborin-resistenten Mutanten)

Um bei den Eliminierungsversuchen mit Diazaborin höhere Konzentrationen von Dz anwenden zu können, mußten Dz-resistente Kulturen hergestellt werden.

Zunächst wurden 20 Chinablau-Lactose-Platten mit einer Konzentration von 20 µg Dz/ml Agar hergestellt und jede Platte mit 0,2 ml von ausgewachsenen $F'lac^+$-tragenden E.coli W 3110-Stämmen aus NI-Bouillon-Röhrchen beimpft.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C entnahm ich jede einzelne gewachsene Kolonie und strich sie (einzeln!) auf Chinablau-Lactose-Agar-Platten mit 20 µg Dz/ml als Inhalt aus.

Die nun auf Dz-haltigem Agar gewachsenen Kolonien waren sicher Dz-resistent geworden. Zur Kontrolle wurden die MHK von Dz gegen einige Einzelkolonien bestimmt; sie lagen bei 512 µg/ml.

Von den Dz-resistenten Kulturen wurden Dauerkulturen (im Dauerkulturagar) angelegt und für Eliminierungsversuche mit höheren Dz-Konzentrationen verwendet.

2.7 Methode zur Eliminierung von Plasmiden

Nachdem die zu untersuchenden Bakterienstämme mit ihren R-Plasmiden hinsichtlich ihrer Antibiotika-Resistenz überprüft worden waren, wurde jeweils 1 Einzelkolonie der auf den Antibiotika-haltigen C 1-Agar-Platten gewachsenen Bakterienkolonien in 4,5 ml steriler NI-Bouillon eingeimpft und über Nacht (ca. 18 Stunden) im Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

Am nächsten Morgen wurde die getrübte Bakteriensuspension 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und 0,1 ml dieser Verdünnung in 4,5 ml frische, sterile NI-Bouillon gegeben (standardisierte Keimeinsaat).

Außerdem erfolgte die Zugabe von 0,5 ml des in Aqua dest. gelösten Diazaborins bzw. Acridin Orange in die NI-Bouillon, und zwar mit den folgenden Konzentrationen: 0 (Kontrolle), 20, 40, 80, 160, 320, 640 und 1280 µg/ml (AO: 320 µg/ml als Kontrolle).
Das entsprach durch die 1 : 10 Bouillon-Verdünnung Konzentrationen von 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 µg Dz/ml (AO: 32 µg/ml als Kontrolle).
Die Diazaborin (AO) - Konzentrationen lagen dabei um eine oder mehrere Stufen unter der MHK, so

daß keine Hemmung des Bakterienwachstums resultieren konnte.

Nach der statischen 18-stündigen Bebrütung (37°C) wurde die gewachsene Bouillonkultur in physiologischer Kochsalzlösung bis zu 10^{-6} verdünnt. Jeweils 0,1 ml der 10^{-6} und 10^{-5}-Verdünnungen wurde mit sterilen Glasspateln auf Chinablau-Lactose-Agar-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

Nach der Keimzahlbestimmung am nächsten Morgen wurden die F-Faktor- und R-Faktor-Eliminierung auf unterschiedlichen Wegen nachgewiesen.

F-Faktor-Eliminierung:

Eine F-Faktor-Eliminierung bedeutete, daß die Bakterienkolonien ihr F'lac$^+$-Plasmid durch Diazaborin oder Acridin Orange verloren hatten und lac$^-$ geworden waren. Die Lactose-negativen Bakterien wurden als farblose Kolonien auf den Cl-Agar-Platten sichtbar.

Bei der R-Faktor-Eliminierung wurden von den Cl-Agar-Platten jeweils 48 ^{X} der mit Diazaborin behandelten Einzelkolonien auf Mikrotiterplatten mit 0,2 ml Nutrient-I-Bouillon als Inhalt eingeimpft und nach steriler Abdekkung über Nacht statisch bei 37°C bebrütet.

Die Weiterverarbeitung der gewachsenen Einzelkolonien erfolgte dann mit der Replika-Technik (siehe 2.8).

X Anm.: Die Zahl der Kolonien galt für jede der angegebenen Diazaborin-Konzentrationen

2.8 Replika-Technik

Die nach dem unter 2.7 beschriebenen Verfahren auf Mikrotiterplatten erhaltenen 48 Einzelkulturen wurden mit einem vorher abgeflammten Stahlstempel mit Stahlstiften auf vorbereitete Cl-Agar-Platten mit Antibiotikazusatz (s. 2.3.7 - 2.3.16) und auf Kontrollplatten ohne Antibiotika überstempelt. Als weitere Kontrolle diente die Überstempelung von Antibiotikasensiblen (E.coli W3110 ohne Plasmid) und Antibiotikaresistenten Stämmen auf allen Platten.

Nach 18-stündiger statischer Bebrütung bei 37°C konnte durch Vergleiche mit den Kontrollplatten festgestellt werden, auf welchen Antibiotika-Platten keine Kolonien wuchsen, diese Kolonien also ihr R-Plasmid gegen dieses Antibiotikum verloren hatten und somit Antibiotika-sensibel geworden waren.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden alle sensiblen Kolonien einzeln von den Kontrollplatten mit sterilen Glasstäben in 1 ml Müller-Hinton-Bouillon eingeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet; zur Kontrolle wurden jeweils 1 Antibiotika-resistente Einzelkolonie und 1 Antibiotika-sensible Kolonie von E.coli W3110 ohne Plasmid dem gleichen Verfahren unterzogen.

Am nächsten Morgen erfolgte die Entnahme und Verdünnung von 0,5 ml der getrübten Bakteriensuspensionen mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1000.

2 ml dieser Verdünnungen wurden jeweils auf Cl-Agar-Platten übergossen, gleichmäßig verteilt und mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Antibiotika-Blättchen, um die Hemmung der sensibel gewordenen Bakterienkolonien durch die Antibiotika festzuhalten.

Nach der 18-stündigen statischen Bebrütung bei 37°C wurden die Hemmhofdurchmesser um die Antibiotika-Blättchen herum mit dem Lineal ausgemessen. Man erhielt nun aufgrund der Größe des Hemmhofdurchmessers eine deutliche Aussage darüber, ob die Einzelkolonien gegen das betreffende Antibiotikum sensibel geworden oder resistent geblieben waren.

Als Richtlinien dienten die von der PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE (5) gewonnenen Hemmzonendurchmesser für Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin und Tetrazyklin.

Chemotherapeutikum	µg/Blättchen	Hemmzonendurchmesser in mm für		
		resistent	mäßig empfindlich	empfindlich
		≤	von - bis	≥
Ampicillin	10	13	14 - 18	19
Chloramphenicol	30	12	13 - 17	18
Kanamycin	30	13	14 - 17	18
Streptomycin	10	10	11 - 13	14
Tetrazyklin	30	16	17 - 21	22

Ab-sensibel gewordene Kolonien mußten damit ihr R-Plasmid durch die Behandlung mit Diazaborin verloren haben.

2.9 Methode zur Übertragung von R-Plasmiden (Konjugation)

Als Donor diente S.typhimurium (NA^s, lac^-) mit dem R 1767-Plasmid (Cm^r, Sm^r, Tc^r, Ap^r, Col I, tra^+). Als Rezipienten fungierten 2 Einzelkolonien von E.coli K12 W 3110 NA^r, lac^+ mit eliminiertem R 1767 und 1 Einzelkolonie von E.coli K12 W 3110 NA^r, lac^+ ohne R 1767-Plasmid (als Kontrolle).

Die Donor- und Rezipientenkolonien wurden getrennt in 4,5 ml steriler NI-Bouillon eingeimpft und über Nacht (ca. 18 Stunden) im Brutschrank bei 37°C bebrütet.

Nach der Verdünnung aller Bakterienkulturen (einzeln!) in NI-Bouillon im Verhältnis 1 : 10 wurden jeweils 1 ml von S.typhimurium als Donor zu 1 ml der 3 Rezipienten-Kulturen von E.coli W 3110 NA^r in die Röhrchen gegeben und über Nacht statisch bei 37°C bebrütet.

Von diesen Mischkulturen und von den gewachsenen Rezipientenkolonien (ohne Donor) wurden 0,1 ml mit sterilen Glasspateln auf Cl-Agar-Platten ausgespatelt, die sowohl 20 µg NA/ml als auch jeweils eines der Antibiotika enthielten, gegen die der zu übertragende R-Faktor die ihn tragende Wirtszelle resistent macht (angewendet wurden 20 µg Ap/ml und 10 µg Tc/ml).

Nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C konnten die auf diesen Platten gewachsenen Einzelkolonien weiterverarbeitet werden; diese Einzelkolonien hatten also ihre Resistenz durch die R-Plasmid-Übertragung erhalten und wuchsen deshalb auf Antibiotika-haltigem Cl-Agar.

Die aus den Konjugationsexperimenten gewonnenen Transkonjuganten sind auf Seite 8 unter Punkt 2.1 in den Spalten 6 und 7 aufgeführt.

3. Eigene Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht, ob das Diazaborin CG 3401 Plasmide zu eliminieren vermag und somit als Breitspektruminhibitor wirken kann. Vor den eigentlichen Versuchen wurde

3.1 Der Einfluß des Diazaborin CG 3401 auf das Wachstum von Bakterienkolonien des E.coli W3110-Stammes

dargestellt. Dazu wurde untersucht, in welcher Weise das Diazaborin CG 3401 die Wachstumskurve von E.coli W 3110 verändern kann. Bakterienkulturen, die von 8×10^3/ml bis $1{,}4 \times 10^7$/ml ohne Zusatz von Diazaborin wuchsen, wurde 2 Stunden nach Beginn der Bebrütung in getrennten Ansätzen das Diazaborin in den verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

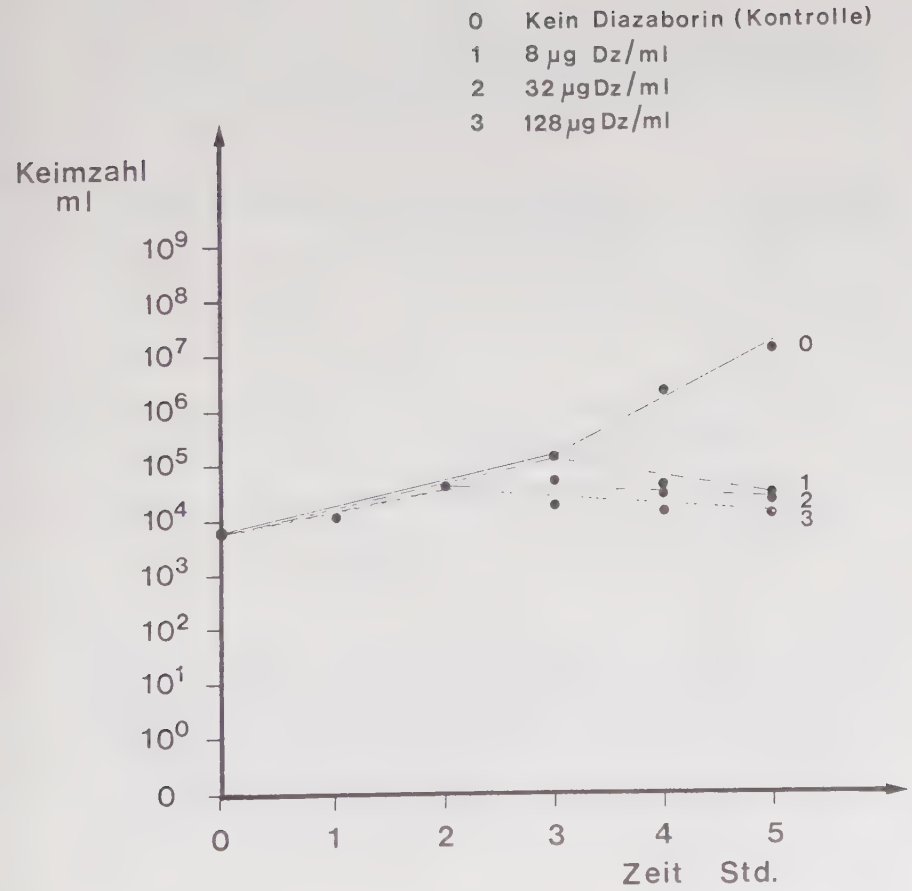
Auf der Abbildung 1 erkennt man eine konzentrationsabhängige bakteriostatische Hemmung des Wachstums von E.coli W3110. Die Zahlenwerte für die Abbildung 1 sind dabei der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 zu Abbildung 1: Wirkung von Diazaborin CG 3401 auf das Wachstum von Bakterienkolonien des E.coli W3110-Stammes

Zeit (Stunden)	0 (Kontrolle) / ugDz/ml	1 (8 / ugDz/ml)	2 (32 / ugDz/ml)	3 (128 / ugDz/ml)
0	8×10^3	8×10^3	8×10^3	8×10^3
1	16×10^3	16×10^3	16×10^3	16×10^3
2	$4{,}6 \times 10^4$	$4{,}6 \times 10^4$	$4{,}6 \times 10^4$	$4{,}6 \times 10^4$
3	$2{,}2 \times 10^5$	2×10^5	$6{,}4 \times 10^4$	$2{,}6 \times 10^4$
4	$3{,}6 \times 10^6$	$6{,}0 \times 10^4$	4×10^4	$2{,}0 \times 10^4$
5	$1{,}4 \times 10^7$	4×10^4	3×10^4	$1{,}2 \times 10^4$

Anm.: Die Keimzahlen der gewachsenen Bakterienkulturen pro ml wurden mit Hilfe von verschiedenen auf Nutrient-I-Nähragarplatten aufgetragenen Verdünnungen ($1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$) ermittelt.

Abb.1: Wirkung von Diazaborin CG 3401 auf das Wachstum von Bakterienpopulationen des Ecoli - W 3110 - Stammes.



3.2 Die Wirkung von dem Diazaborin CG 3401 auf Plasmid-tragende und Plasmid-lose E.coli W3110-Stämme

Um festzustellen, ob das Vorhandensein eines Plasmids einen Einfluß auf die bakteriostatische Wirkung des Diazaborins gegenüber E.coli-Stämmen hat, wurden die MHK-Werte von Diazaborin CG 3401 gegen Plasmid-tragende und Plasmid-lose E.coli W3110-Stämme ermittelt und in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Dabei ist ersichtlich, daß die MHK-Werte bei Plasmid-tragenden E.coli-Stämmen um zwei bis drei Stufen höher liegen als bei Plasmid-losen E.coli W3110-Stämmen.

Tabelle 2: MHK von Diazaborin gegen Plasmid-tragende und Plasmid-lose E.coli W3110-Stämme

Plasmid	MHK (µg/ml)
- (ohne Plasmid)	8
F'lac$^+$	64
RA - 1	64
R 100	32
R s-a	16
R 1767	64

3.3 F-Faktor-Eliminierung durch Acridin Orange (Tabelle 3)

Ausgangsstamm: E.coli W 3110 Rif^r, lac^- mit dem Plasmid $F'lac^+$ (Lactose positiv durch das $F'lac^+$-Plasmid)

Da der F-Faktor seit den Eliminierungsversuchen mit Akridinen im Jahre 1957 durch Hirota (Literaturverzeichnis) als Standardbeispiel der Eliminierung von Plasmiden gilt, wurde zunächst der Nachweis erbracht, daß eine F-Faktor-Eliminierung durch Acridin Orange auch unter unseren Laborbedingungen und mit unseren Methoden möglich ist.

Die Tabelle 3 zeigt eine Eliminierung des F-Plasmids aus dem Stamm E.coli W 3110 Rif^r, lac^- in 40 % der Fälle bei einer Konzentration von 32 µg AO/ml.

Plasmid	MHK(AO)	AO-Konz. (µg/ml)	Keimzahl pro ml	Anzahl an lac^+	Anzahl an lac^-	% Elim.
$F'lac^+$	64 µg/ml	0	$5{,}0 \times 10^7$	50	0	0
		32	$4{,}0 \times 10^7$	24	16	40

3.4 F-Faktor-Eliminierung durch das Diazaborin CG 3401

Stämme: E.coli W 3110 Rif^r
E.coli W 3110 Dz^r Rif^r (Dz-resistente Mutante)
E.coli W 3110 NA^r

In der nächsten Versuchsreihe widmete ich mich der Fragestellung, ob auch das Diazaborin CG 3401 F-Plasmide zu zerstören vermag. Die unterschiedlichen Eliminierungsergebnisse der drei behandelten E.coli W 3110-Stämme in Tabelle 4 fallen durch eine große Streuungsbreite zwischen den Einzelversuchen ins Auge.

Tabelle 4: Eliminierung von F'lac$^+$ durch das Diazaborin CG 3401 (Aufstellung aller Ergebnisse)

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz. (µg/ml)	1977 22.07	26.08.	09.09.	23.09.
				in %	in %	in %	in %
E.coli	F'lac$^+$	64	0	0	0	2,4	1,7
W3110			2	6,8	4,7	5,2	4,1
Rif^r			4	12,9	21,7	5,5	8,7
			8		28,9	12,9	8,7
			16				12,5
			32			6,2	81,3
E.coli	F'lac$^+$	512	0			4,8	1,8
W3110			32			7,8	13,7
Dz^r,Rif^r			64			6,9	17,3
			128			7,3	21,8
E.coli	F'lac$^+$	64	0	0	0	0,3	0,3
W3110			2	0	2,3	1,6	9,2
NA^r			4	0	5,3		13,4
			8		34,5	2,2	15,7
			16			2,6	16,0
			32				16,3

Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit zwischen steigender Dz-Konzentration und zunehmender Eliminierung besteht, sollte eine Regressionsgerade erstellt werden. Dazu wurden der logarithmische Wert der entsprechenden Dz-Konzentration, die mittlere Keimzahl pro ml bei allen Versuchen, die Summe aller lac$^+$ und aller lac$^-$ Kolonien für jede einzelne Konzentration und die prozentuale Eliminierung, die schließlich in der letzten Spalte dergestalt korrigiert wurde, daß von allen Werten jeweils der 0-Wert subtrahiert wurde, errechnet.

Tabelle 5 zu den Abbildungen 2, 3, 4 und 5

Eliminierung von F'lac$^+$ durch das Diazaborin CG 3401 (Zusammenfassung)

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz.	lg Dz	Keimz./ml 10^7	Anzahl lac$^+$	Anzahl lac$^-$	% Elim.	$\bar{X}$ nach Korr.
E.coli	F'lac$^+$	64	0		16,6	684	10	1,4	
W3110			2	0,301	11,9	452	23	4,8	3,4
Rif^r			4	0,602	15,2	546	63	10,3	8,9
			8	0,903	9,4	229	53	18,8	17,4
			16	1,204	31,3	264	49	12,5	11,1
			32	1,505	13,3	525	206	28,2	26,8
E.coli	F'lac$^+$	512	0		23,1	446	16	3,4	
W3110			32	1,505	27,5	494	56	10,2	6,8
Rif^{r}Dz^r			64	1,806	20,1	358	44	10,9	7,5
			128	2,107	10,7	391	75	16,1	12,7
E.coli	F'lac$^+$	64	0		47,0	1409	3	0,3	
W3110			2	0,301	19,0	357	15	4,0	3,7
NA^r			4	0,602	11,3	150	19	11,2	10,9
			8	0,903	14,3	494	35	6,6	6,3
			16	1,204	10,5	186	23	11,0	10,7
			32	1,505	8,6	72	14	16,3	16,0

Korrektur: Der O-Wert wurde von den anderen Werten subtrahiert.

Die in Tabelle 5 dargestellte Abhängigkeit zwischen der steigenden Dz-Konzentration und der zunehmenden Eliminierbarkeit von F'lac$^+$ wurde graphisch anhand des Verhältnisses der logarithmischen Dz-Konzentration zur prozentualen Eliminierung ($\log_{10}$Dz-Konz./%Elim.) in den Abbildungen 2, 3, 4 und 5 verdeutlicht. Die Geraden wurden dabei mit Hilfe der errechneten Gleichungen gezeichnet.

Berechnung der Regressionsgeraden von $\log_{10}$Dz-Konz. gegen Elim.

(Werte für die Abbildungen 2, 3, 4 und 5)

Die Formel für die Regressionsgeraden lautet:

$\log_{10} Y = A1 \cdot x - A0$

1. E.coli W 3110 Rif^r

A0 = 0,28188E + 00
A1 = 0,45948E - 01
Stabw. = 0,27595E + 00
Korrelationskoeff. = 0,76148E + 00

$\log_{10}$Dz-Konz. (Y) = 0,045948x + 0,28188 (Abschnitt)

x = 3,4	: log y	= 0,4381	→ Y= 2,742
x = 8,9	: log y	= 0,6908	→ Y= 4,907
x = 17,4	: log y	= 0,8814	→ Y= 7,611
x = 11,1	: log y	= 0,7919	→ Y= 6,193
x = 26,8	: log y	= 1,5133	→ Y= 32,605

2. E.coli W 3110 $Rif^r Dz^r$

A0 = 0,10369E + 01
A1 = 0,85470E - 01
Stabw. = 0,17157E + 00
Korrelationskoeff. = 0,71608E + 00

$\log_{10}$Dz-Konz. (Y) = 0,08547x + 1,0369

x = 6,8	: log y	= 1,6181	→ Y= 41,505
x = 7,5	: log y	= 1,6780	→ Y= 47,64
x = 12,7	: log y	= 2,1224	→ Y=132,6

3. E.coli W 3110 NA^r

A0 = 0,12204E + 00
A1 = 0,82043E - 01
Stabw. = 0,31811E + 00
Korrelationskoeff. = 0,66458E + 00

$\log_{10}$Dz-Konz. (Y) = 0,082043X + 0,12204

x = 3,7	: log y	= 0,4256	→ Y= 2,665
x = 10,9	: log y	= 1,0163	→ Y= 10,38
x = 6,3	: log y	= 0,6389	→ Y= 4,354
x = 10,7	: log y	= 0,999	→ Y= 9,997
x = 16,0	: log y	= 1,4347	→ Y= 27,21

Abb.2: Eliminierung von F'lac$^+$ (E.coli W3110 Rif^r) durch das Diazaborin CG 3401.

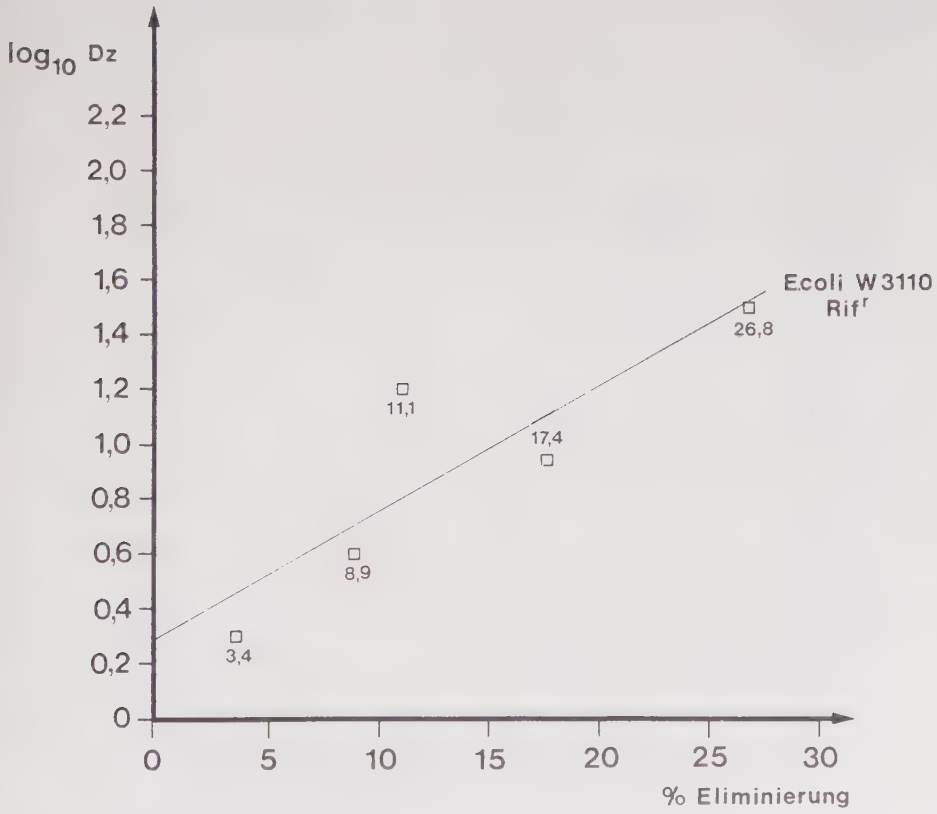


Abb.3: Eliminierung von F'lac$^+$ (E.coli W3110 Rif^r, Dz-resistente Mutante) durch das Diazaborin CG 3401.

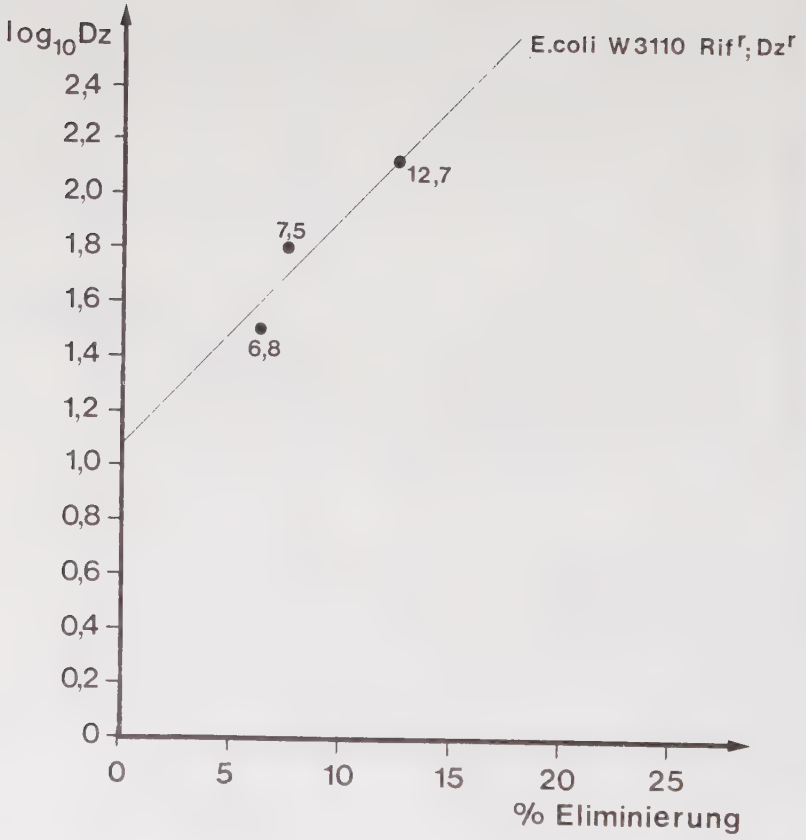


Abb.4: Eliminierung von F'lac$^+$ (E.coli W3110 NA^r) durch das Diazaborin CG 3401.

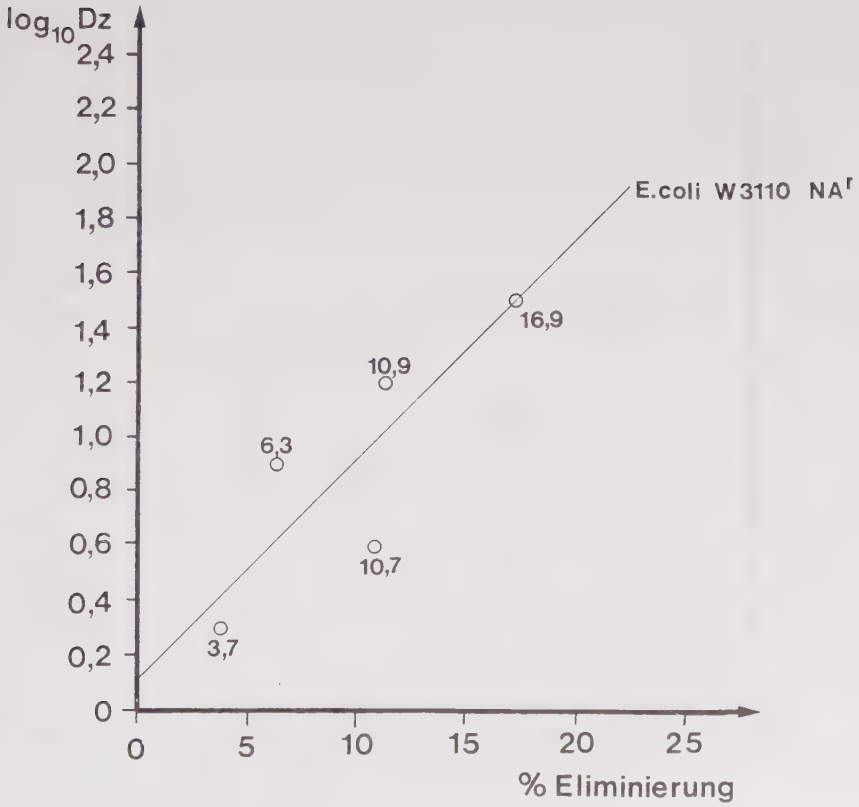
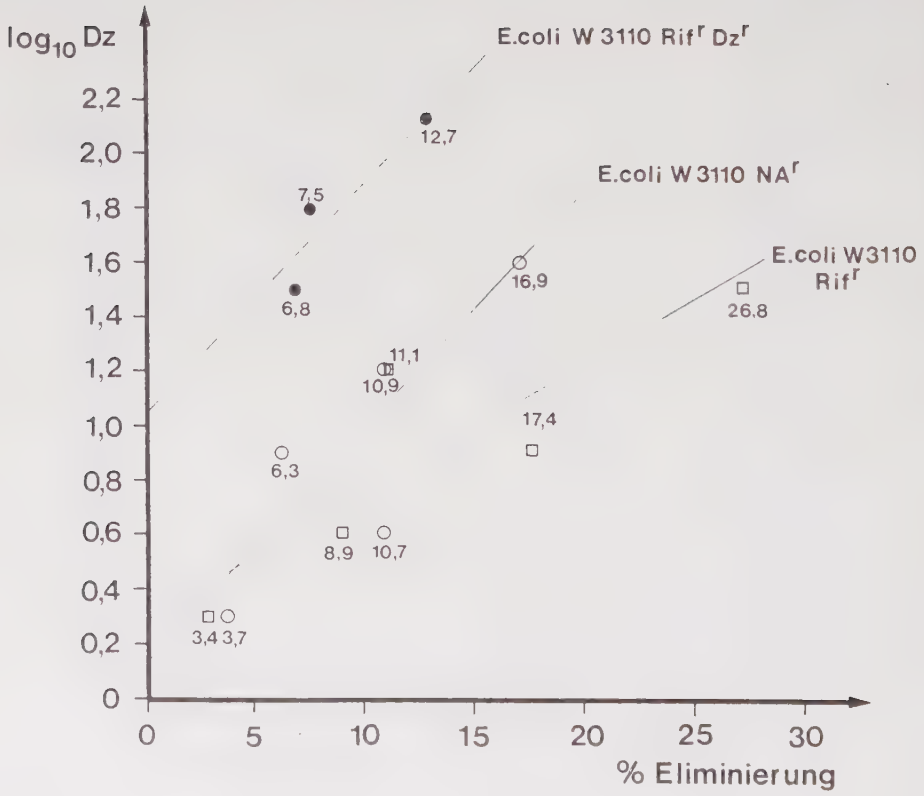


Abb. 5: Eliminierung von F'lac$^+$ bei E.coli W 3110 Rif^r, E.coli W 3110 Rif^r Dz^r und E.coli W 3110 NA^r durch das Diazaborin CG 3401 (Gesamtschau).



3.5 R-Faktor-Eliminierung durch das Diazaborin CG 3401

Nach dem Vorbild der F-Faktor-Eliminierung wurde nun die R-Faktor-Eliminierung durch das Diazaborin CG 3401 unter sucht. Die Ergebnisse der einzelnen Eliminierungsversuche sind in den nachfolgenden Tabellen 6 - 11 aufgeführt.

Es zeigt sich, daß die Eliminierung von R-Plasmiden von der Art des Plasmids abhängt: während sich die Plasmide RA-1 (Tabelle 6), R 100 (Tabelle 7) und R S-a (Tabelle 8) mit Diazaborin-Konzentrationen bis 1 Stufe unter der jeweiligen MHK nicht zerstören ließen, gelang dies bei R 1767 bei zwei von vier Resistenzdeterminanten in bis zu 67,2 % der Fälle, wie Tabelle 9 zeigt.

Tabelle 6 : Eliminierung von RA 1 durch das Diazaborin CG 3401

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz./ug/ml	Keimz./ml	Zahl d. Kolonien ohne Res.	% Elim.
E.coli W3110NA^{r} lac^{+}	RA 1	64	0	$17,1 \times 10^{7}$	SU : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			2	$6,7 \times 10^{7}$	SU : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			4	$4,1 \times 10^{7}$	SU : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			6	$2,6 \times 10^{7}$	SU : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			32	$2,0 \times 10^{7}$	SU : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0

Tabelle 7: Eliminierung von R 100 durch das Diazaborin CG 3401

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz. (µg/ml)	Keimzahl/ ml	Zahl der Kolonien ohne Res.	% Elim.
E.coli W 3110 NA^r, lac^-	R 100	32	0	$17,9 \times 10^7$	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			2	$6,0 \times 10^7$	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			4	$3,0 \times 10^6$	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			6	$3,8 \times 10^7$	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0
			16	$2,7 \times 10^7$	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Tc : 0	0
					Kontr.:0	0

Tabelle 8: Eliminierung von R S-a durch das Diazaborin CG 3401

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz. (/ug/ml)	Keimz./ml 10^7	Zahl der Kolonien ohne Res.	% Elim.
E.coli W3110 NA^r, lac^+	R S-a	16	0	41,8	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Cm : 0	0
					Km : 0	0
					Kontr.:0	0
			2	4,6	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Cm : 0	0
					Km : 0	0
					Kontr.:0	0
			4	4,3	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Cm : 0	0
					Km : 0	0
					Kontr.:0	0
			6	3,5	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Cm : 0	0
					Km : 0	0
					Kontr.:0	0
			8	18,8	SU : 0	0
					Sm : 0	0
					Cm : 0	0
					Km : 0	0
					Kontr.:0	0

Tabelle 9:

Eliminierung von R 1767 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tc^r, tra^+, Col I) durch das Diazaborin CG 3401

Stamm	Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz. (µg/ml)	Keimz./ml 10^7	Determ.	1977 27.10. %	17.11. %	25.11. %	09.12. %	% Elim.($\bar{x}$)
E.coli W3110 NA^r, lac^-	R 1767	64	0	21,6	Ap	4,2	0	0	0	1,1
					Cm	0	0	0	0	0
					Sm	0	0	0	0	0
					Tc	6,3	0	0	0	1,6
					Kontr.	0	0	0	0	0
			2	11,2	Ap		0		12,5	6,3
					Cm		0			0
					Sm		0			0
					Tc		0		22,9	11,5
					Kontr.		0		0	0
			4	25,1	Ap		2,1	4,2	12,5	6,3
					Cm		0			0
					Sm		0			0
					Tc		2,1	56,3	50,0	36,1
					Kontr.		0	0	0	0
			8	19,7	Ap		25,0	8,4	41,7	25,0
					Cm		0	0	0	0
					Sm		0	0	0	0
					Tc		33,3	73,9	77,1	61,4
					Kontr.		0	0	0	0
			16	7,6	Ap	71,0	25,0	8,4	52,1	39,1
					Cm	0	0			0
					Sm	0	0			0
					Tc	25,0	39,6	81,3	77,1	55,8
					Kontr.	0	0	0	0	0
			32	5,7	Ap	97,9	58,3	8,4	56,3	55,2
					Cm	0	0			0
					Sm	0	0			0
					Tc	22,9	58,3	91,7	95,9	67,2
					Kontr.	0	0	0	0	0

Wie bei der Eliminierung von F-Plasmiden (siehe 3.4 und Tabelle 4) unterliegen auch die einzelnen Eliminierungsversuche von R 1767 durch das Diazaborin CG 3401 starken Schwankungen, wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird. Es zeigt sich auch hier, daß die Eliminierung von R 1767 konzentrationsabhängig ist und daß Diazaborin eine spezifische Wirkung auf R-Determinanten hat:

Im Gegensatz zu den Cm- und Sm-Determinanten konnten die Ap- und Tc-Determinanten bei Konzentrationen bis 32 /ug Dz/ml (1 Stufe unter der MHK) in 55,2 % bzw. bis zu 67,2 % der Fälle zerstört werden.

Wenn man in der Tabelle 10 nur die Eliminierung der Ap- und Tc-Determinanten gesondert betrachtet, und die Spontanelimination bei 0 /ug Dz/ml von den anderen Meßwerten subtrahiert, läßt sich die eindrucksvolle Abhängigkeit des Plasmid-Verlustes von der Höhe der Diazaborin-Konzentration in Tabelle 10 hervorheben.

Die höchste Plasmid-Eliminierung wurde bei 32 /ug Dz/ml erreicht. Aber bereits bei 4 /ug/ml und besonders bei 8 /ug Dz/ml erfolgte eine starke Zunahme der Eliminierungspotenz, die sich bis 32 /ug Dz/ml steigert und dort ihren Höhepunkt erreicht.

Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit zwischen steigender Dz-Konzentration und zunehmender Eliminierung der Ap- und Tc-Determinanten besteht, sollte wie bei dem Beispiel der Eliminierung von F'lac$^+$ (Tabelle 5, Abbildungen 2, 3, 4 und 5), eine Regressionsgerade erstellt werden. Dazu wurden der logarithmische Wert der entsprechenden Dz-Konzentration, die mittlere Keimzahl pro ml bei allen Versuchen, und die prozentuale Eliminierung, die schließlich in der letzten Spalte dergestalt korrigiert wurde, daß von allen Werten jeweils der 0-Wert subtrahiert wurde, errechnet.

Tabelle 10: Eliminierung von R 1767 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tc^r, tra^+, Col I) durch das Diazaborin CG 3401 (nur Ap- und Tc-Determinante)

MHK (Dz)	Dz-Konz. (µg/ml)	$\log_{10}$Dz	Keimz./ml 10^7	Determin.	% Elim. ($\bar{X}$)	$\bar{X}$ nach Korrektur %
64	0		21,6	Ap	1,1	
				Tc	1,6	
	2	0,301	11,2	Ap	6,3	5,2
				Tc	11,5	9,9
	4	0,602	25,1	Ap	6,3	5,2
				Tc	36,1	34,5
	8	0,903	19,7	Ap	25,0	23,9
				Tc	61,4	59,8
	16	1,204	7,6	Ap	39,1	38,0
				Tc	55,8	54,2
	32	1,505	5,7	Ap	55,2	54,1
				Tc	67,2	65,6

Korrektur: Der 0-Wert wurde von den anderen Meßwerten subtrahiert.

Der in Tabelle 10 dargestellte Zusammenhang zwischen steigender Diazaborin-Konzentration und zunehmender R 1767-Eliminierung wurde wie bei 3.4 graphisch anhand des Verhältnisses der logarithmischen Dz-Konzentration zur prozentualen Eliminierung ($\log_{10}$Dz-Konz./% Elim.) in den Abbildungen 6,7 und 8 verdeutlicht. Die Geraden wurden dabei wiederum mit Hilfe der errechneten Geradengleichung gezeichnet.

Berechnung der Regressionsgeraden von $\log_{10}$Dz-Konz. gegen Elim.

(Werte für die Abbildungen 6, 7 und 8)

Die Formel für die Regressionsgeraden lautet:
$\log_{10} Y = A1 \cdot x + A0$

1. E.coli W 3110 NA^r + R 1767 (Ap-Determ.)

A0 = 0,35116E + 00
A1 = 0,21833E - 01
Stabw. = 0,12629E + 00
Korrelationskoeff. = 0,95499E + 00

$\log_{10}$Dz-Konz. (Y) = 0,021833 + 0,35116
x = 5,2 : log y = 0,46469 → Y = 2,917
x = 23,9 : log y = 0,84514 → Y = 7,000
x = 38,0 : log y = 1,18079 → Y = 15,16
x = 54,1 : log y = 1,5323 → Y = 34,06

2. E.coli W 3110 NA^r + R 1767 (Tc-Determ.)

A0 = 0,49008E - 01
A1 = 0,19064E - 01
Stabw. = 0,22643E + 00
Korrelationskoeff. = 0,84682E + 00

$\log_{10}$Dz-Konz. (Y) = 0,019064X + 0,049008
x = 9,9 : log y = 0,23774 → Y = 1,729
x = 34,5 : log y = 0,70672 → Y = 5,090
x = 59,8 : log y = 1,1890 → Y = 15,45
x = 54,2 : log y = 1,0823 → Y = 12,09
x = 65,6 : log y = 1,2984 → Y = 19,87

Abb.6: Eliminierung von R 1767 (E.coli W3110 NA^r) durch das Diazaborin CG 3401 (Ap-Determ.)

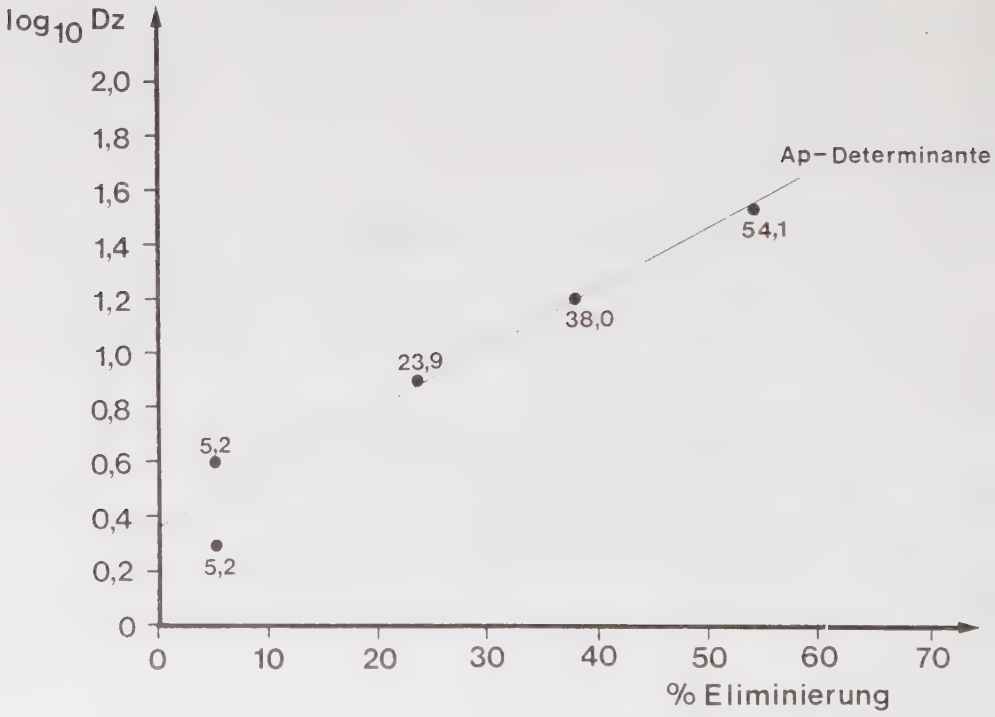


Abb.7: Eliminierung von R 1767 (E.coli W 3110 NA^r) durch das Diazaborin CG 3401 (Tc-Determinante).

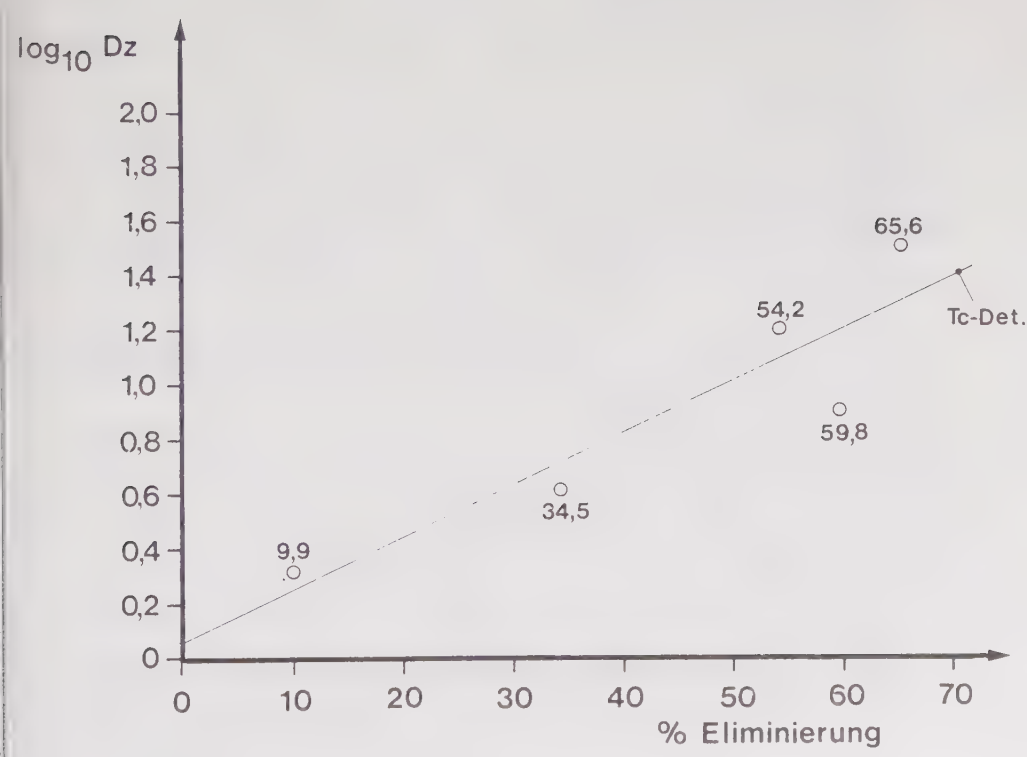
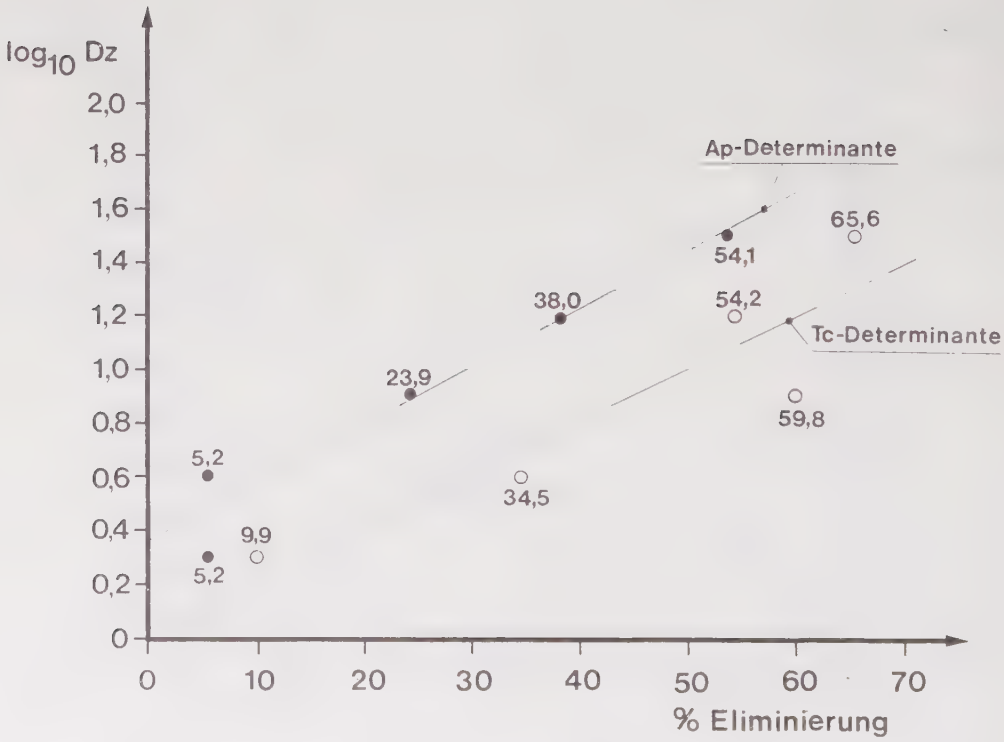


Abb.8: Eliminierung von R 1767 (E.coli W 3110 NA^r) durch das Diazaborin CG 3401 (Ap-u.Tc-Determ.)



Nachdem die konzentrationsabhängige Eliminierung der Resistenz-Determinanten Ap und Tc von R 1767 mit den 4 Resistenz-Determinanten Ap, Cm, Sm und Tc durch das Diazaborin CG 3401 nachgewiesen war, wurde die Eliminierung von R 1767 mit einzeln vorliegender Ap-Determinante bei den Stämmen E.coli C 600 und E.coli W 3110 durch dieses Diazaborin untersucht.

Die Tabelle 11 verdeutlicht, daß die Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen außerordentlich hoch ist. Es scheint auch hier der Fall zu sein, als hänge die Eliminierung von der Konfiguration des jeweiligen R-Plasmids und (in abgeschwächtem Maße) auch vom Wirtsstamm ab.

Während nämlich bei E.coli C 600 Sm^r mit R 1767 (Ap^r) ein Plasmid-Verlust von 13,6 % stattfand, konnte die Ap-Determinante bei E.coli W 3110 NA^r + R 1767 nicht eliminiert werden (siehe Tabelle 11 auf Seite 40).

Im Gegensatz zum Ergebnis in Tabelle 10, wo die Ap-Determinante beim gleichen E.coli W 3110 NA^r-Stamm mit R 1767 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tc^r, tra^+, Col I) mit der gleichen Konzentration von 16 µg Dz/ml in 39,1 % der Fälle zerstört worden war, ließ sich beim gleichen E.coli W 3110 NA^r-Stamm + R 1767 mit einzeln vorliegender Ap-Determinante kein Eliminierungseffekt erreichen.

Tabelle 11: Eliminierung von R 1767 (nur Ap-Determinante vorliegend) durch das Diazaborin CG 3401

Stämme: E.coli C 600, Sm^r, lac^- + R 1767 (Ap^r, tra^-, transf.)
E.coli W 3110, NA^r, lac^+ + R 1767 (Ap^r, tra^-, transk.)

Plasmid	MHK (Dz)	Dz-Konz. (µg/ml)	Keimz./ml 10^7	Determ.	9.12.77 %	19.12.77 %	31.1.78 %	$\bar{x}$ %
R 1767	32	0	47,5	Ap	2,1	2,1	3,2	2,5
(Ap^r, tra^-,		8	30,3	Ap			2,1	2,1
transf.)		16	14,1	Ap	11,5	29,2	0	13,6
R 1767	32	0	35,3	Ap	0	0	0	0
(Ap^r, tra^-,		8	31,5	Ap			0	0
transk.)		16	6,1	Ap	0	0	0	0

3.6 Die MHK von E.coli W 3110-Stämmen nach Eliminierung von Plasmiden mit Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenz

Nach der Plasmid-Eliminierung wurden einige Bakterienstämme stichprobenartig isoliert, um ihre MHK gegen Ampicillin und Tetrazyklin zu prüfen. Vergleichsweise wurden der Plasmid-lose Ausgangsstamm E.coli W 3110 und ein Plasmid-tragender E.coli W 3110-Stamm untersucht. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12

Stamm	MHK (Ap)	MHK (Tc)
E.coli W 3110 NA^r ohne Plasmid	2 µg/ml	0,25 µg/ml
E.coli W 3110 NA^r + R 1767 (Ap^r, Cm^r, Sm^r, Tc^r)	256 µg/ml	32 µg/ml
E.coli W 3110 NA^r + elim. R 1767	2 µg/ml	0,25 µg/ml

Dabei erkennt man eine beträchtliche Zunahme der MHK bei R-Plasmid-tragenden E.coli-Stämmen (um 7 - 8 Stufen) gegenüber Plasmid-losen Stämmen. Auffallend ist aber vor allen Dingen die Gleichheit der MHK-Werte von Plasmid-losen und Plasmid-eliminierten E.coli-Stämmen. Dies läßt folgenden Schluß zu:

Plasmid-eliminierte Bakterienstämme verhalten sich aufgrund der MHK-Messungen so, als ob ihr Plasmid nicht vorhanden bzw. durch Diazaborin inaktiviert worden ist; durch die Plasmid-Eliminierung beziehungsweise Inaktivierung werden die behandelten Stämme also genauso empfindlich gegen Antibiotika (hier: Ampicillin und Tetrazyklin) wie sie vorher ohne Plasmid Antibiotika-sensibel waren. Die Plasmid-Eliminierung durch das Diazaborin CG 3401 führt also zu einem funktionellen Verlust der Antibiotikaresistenz.

4. Diskussion (Schlußfolgerung)

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Diazaborin CG 3401 Plasmide zu eliminieren vermag und im Sinne von HAHN (10) als sogenannter 'Breitspektruminhibitor' hemmend auf die Resistenzentwicklung bei bestimmten E.coli-Bakterienstämmen wirken kann.
Obwohl die Wirkungsmechanismen dieses Diazaborins bisher noch unbekannt sind, wurden die vielfältigen Wirkungen dieser Substanz zum Teil untersucht. Es zeigte nach eigenen Versuchen eine konzentrationsabhängige bakteriostatische Hemmung des Wachstums von E.coli W 3110-Stämmen, wie die Abbildung 1 auf der Seite 20 verdeutlicht, und besaß eine schlechtere Wirkung bei Plasmid-tragenden Bakterienstämmen im Vergleich zu Plasmid-losen Stämmen, wie aus Tabelle 2 auf Seite 21 ersichtlich wird.
WATANABE, OGATA, SUGARAWA, ODA (31) und TAKAHASHI, OKANISHI, UTAHARA, NITTA, MAEDA und UMEZAWA (26) wiesen im Vergleich zur Wirkung des Diazaborins CG 3401 einen gegenteiligen Effekt für Flavomycin bzw. für Macarbomycin nach. Sie beobachteten, daß R-Faktor-tragende Bakterien empfindlicher für Flavomycin bzw. für Macarbomycin seien als Plasmid-lose Stämme, weil die vorhandenen Plasmide die Permeation dieser Antibiotika in die Bakterienzelle durch eine Veränderung der Bakterienoberfläche angeblich erleichterten.

Bei der Betrachtung der Wirkung des Diazaborins CG 3401 auf Plasmide wurde in eigenen Versuchen teilweise eine Eliminierung erreicht. Die R-Faktoren RA 1, R 100 und R s-a konnten durch diese Substanz nicht beeinflußt werden, wie die Tabellen 6, 7 und 8 auf den Seiten 30 - 32 zeigen. Demgegenüber gelang aber eine Eliminierung von F-Plasmiden ($F'lac^+$) und R 1767 als einzigem R-Faktor in unterschiedlichem Maße. Dabei ließ sich mit Hilfe von errechneten Regressionsgeraden eine statistisch fundierte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der $F'lac^+$- und R 1767-Eliminierung und

der Diazaborin-Konzentration darstellen, wie die Abbildungen 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 auf Seiten 26 - 29 und 37 - 39 verdeutlichen: je höher die Diazaborin-Konzentration lag, desto besser war auch die Eliminierungsquote, die bei einer R-Determinante von R 1767 sogar 65,6 % erreichte.
Die Eliminierungsraten wiesen jedoch eine große Streubreite bei den einzelnen Versuchen auf und lagen bei R 1767 (siehe Tabelle 10 auf Seite 35) wesentlich höher als bei F'lac (siehe Tabelle 5 auf Seite 24). Der F-Faktor konnte nach eigenen Ergebnissen in bis zu 26,8 % der Fälle durch das Diazaborin CG 3401 (siehe Tabelle 5 auf Seite 24) und in 40 % der Fälle durch Acridin Orange (siehe Tabelle 3 auf Seite 22) eliminiert werden. Diese Werte lagen zwar deutlich unter den von HIROTA und ILJIMA (15, 16) für Acridin Orange erreichten Quoten von fast 100 %, aber gegenüber dem Null-Wert der Kontrolle ließ sich dennoch eine eindeutige Aussage über die Eliminierungspotenz von Acridin Orange und Diazaborin machen.

Die Gleichheit der MHK-Werte von Plasmid-losen und Plasmid-eliminierten E.coli-Stämmen gegen Ampicillin und Tetrazyklin (siehe Tabelle 12 auf Seite 41) ließ folgenden Schluß zu: Plasmid-eliminierte Bakterienstämme verhalten sich aufgrund der MHK-Messungen so, als ob Anteile ihres Plasmids durch das Diazaborin CG 3401 inaktiviert worden sind. Durch diese Eliminierung werden die behandelten Stämme also genauso empfindlich gegen Antibiotika, wie sie ohne Plasmid waren. Die Plasmid-Eliminierung durch dieses Diazaborin führte also zu einem funktionellen Verlust der Antibiotikaresistenz.

Die Eliminierungsmöglichkeiten von Plasmiden durch verschiedene chemische Substanzen hängen nach HAHN (10), HIROTA (15) und anderen Autoren und aufgrund von Versuchsergebnissen dieser Arbeit von einigen wichtigen aufgeführten Parametern ab.

1. Die Eliminierungsquoten der Wirkungssubstanzen sind abhängig vom Plasmid-tragenden Wirtsorganismus.
So konnten bei dem Verlust des F-Faktors durch das Diazaborin CG 3401 unterschiedliche Werte bei den Stämmen E.coli W 3110 Rif^r, E.coli W 3110 Rif^r Dz^r und E.coli W 3110 NA^r erarbeitet werden, wie anhand der Tabelle 5 auf Seite 24 ersichtlich wird. Auch bei der Behandlung von R 1767 mit einzeln vorliegender Ampicillin-Determinante fiel auf, daß bei einem E.coli C 600-Stamm mit chromosomaler Streptomycin-Resistenz die Eliminierung in geringem Maße gelang, bei einem E.coli W 3110-Stamm mit chromosomaler Nalidixinsäure-Resistenz dagegen überhaupt nicht, wie Tabelle 11 auf Seite 40 zeigt. Auch MITSUHASHI, HARADA und KAMEDA (21) sowie WATANABE und FUKASAWA (28, 29, 30) stellten deutliche Unterschiede bei dem Verlust von Resistenz-Eigenschaften durch Acriflavin und Acridin Orange bei E.coli und Shigella flexneri fest. Dabei lagen die Eliminierungsraten bei Shigella flexneri höher als bei E.coli-Stämmen, erreichten aber nicht annähernd den 100 %-Wert wie bei der F-Plasmid-Eliminierung durch HIROTA und ILJIMA (15, 16).
BOUANCHAUD, SCAVIZZI und CHABBERT (1) berichteten über einen klar erkennbaren Unterschied bei der Eliminierung von Antibiotika-Resistenzen bei Staphylococcus aureus-Stämmen durch Ethidium Bromid. Sie stellten fest, daß die Penicillin-Resistenz in 8 % bis 100 % der Fälle jeweils zusammen mit der Resistenz gegenüber Quecksilber-Chlorid in Quecksilber-resistenten Stämmen zu eliminieren war, während es bei Quecksilber-sensiblen Stämmen nicht gelang, die Penicillin-Resistenz zu eliminieren.
Bis heute können jedoch keine allgemeingültigen Angaben darüber gemacht werden, in welchen Bakterienstämmen Plasmide leichter oder häufiger zu eliminieren sind als in anderen und warum dies so ist.

2. Der Effekt der Eliminierung beruht auch auf Eigenschaften der zu eliminierenden Plasmide.
Nicht alle Plasmide lassen sich durch das Diazaborin CG 3401

gleich gut beeinflussen. Es bestehen nämlich einerseits starke Unterschiede in der Eliminierung von F'lac$^+$ (maximal 26,8%) und von R 1767 (maximal 65,6 %), andererseits zwischen den verschiedenen R-Faktoren. Während RA 1, R 100 und R s-a durch die Diazaborin-Behandlung nicht angegriffen werden konnten, wie die Tabellen 6, 7 und 8 auf den Seiten 30 - 32 zeigen, gelang dies bei R 1767 in zum Teil sehr hohem Maße, wie aus den Tabellen 9 und 10 auf den Seiten 33 und 35 ersichtlich wird.
Auch HAHN (10), MITSUHASHI, HARADA und KAMEDA (21) sowie WATANABE und FUKASAWA (28, 29, 30) beobachteten eine Abhängigkeit der Eliminierung von den jeweiligen Plasmid-Eigenschaften für Acriflavin und Acridin Orange. Sie fanden heraus, daß diese beiden Substanzen verschiedene R-Faktoren in unterschiedlich hohem Maße, aber nicht mit einem annähernd so hohen Prozentsatz eliminieren konnten, wie es HIROTA (15) bei der Behandlung des F-Faktors mit den gleichen Substanzen gelang (fast 100 % Eliminierung).

3. Nicht alle R-Determinanten eines Plasmids werden gleich gut von der Wirksubstanz angegriffen.
Das Diazaborin CG 3401 scheint eine spezifische Wirkung auf bestimmte R-Determinanten zu besitzen, was besonders bei R 1767 anhand der Tabelle 9 auf Seite 33 erkennbar wird. Hierbei ließen sich die Cm- und Sm-Determinanten nicht eliminieren, während die Ap- und Tc-Determinanten in bis zu 54,1 % bzw. 65,6 % der Fälle durch die Behandlung mit 32 µg Dz/ml verloren gingen. MITSUHASHI, HARADA und KAMEDA (21) beobachteten eine getrennte Eliminierung von R-Determinanten bei nicht transferierbaren R-Faktoren von Staphylococcus aureus-Stämmen. HAHN und CIAK (10, 11, 12) entdeckten, daß die Behandlung von E.coli-Stämmen mit Aminoakridinen zu einer Trennung von R-Determinanten führte. Durch diesen Trennmechanismus würde die bevorzugte Eliminierung einzelner Determinanten zu erklären sein.

HAHN und CIAK (10, 11, 12) wiesen diesen Effekt bei der Eliminierung der Km-, Cm-, Ap-, Sm- und Su-Determinanten von E.coli R S 2 durch intercalierende Substanzen, wie Ethidium Bromid, Quinacrin, Acridin Orange, Berberin, Spermin, Quinin, Chloroquin, p-Rosanilin und Methylen-Blau nach und fanden folgendes heraus:
Nicht alle Determinanten auf dem R-Faktor ließen sich durch die oben aufgeführten intercalierenden Substanzen bei einer Konzentration vom 10^{-4} M gleich gut eliminieren. Während die Sm- und Su-Determinanten nicht verloren gingen, gelang dies bei der Ap-Determinante in bis zu 15 %, bei den Km- und Cm-Determinanten in bis zu 59 % bzw. 61 % der Fälle. Die Eliminierung war aber nur dann wirkungsvoll, wenn alle R-Determinanten auf demselben Plasmid lagen.

4. Die Plasmid-Eliminierung hängt auch noch von der verwendeten Wirksubstanz ab.
Wenn man die Eliminierung von F- und R-Plasmiden bei E.coli-Stämmen durch eine Substanz mit bekanntem Wirkungsmechanismus, wie zum Beispiel dem intercalierenden Acridin Orange, und einer mit unbekanntem Angriffspunkt, beispielsweise dem Diazaborin CG 3401 anhand von zum Teil eigenen Versuchsergebnissen vergleicht, so ergibt sich, daß beide Substanzen anscheinend eine selektive Eliminierung bestimmter Plasmide bewirken. Im Gegensatz zum Diazaborin CG 3401, das bevorzugt auf R-Plasmide und insbesondere auf R 1767 wirkte, griff Acridin-Orange besser die F-Plasmide an. Während Acridin Orange nach HIROTA und ILJIMA (15, 16) in fast 100 % und nach eigenen Versuchen in 40 % der Fälle $F'lac^+$ zu eliminieren vermochte (siehe Tabelle 3 auf Seite 22), erreichte ich mit dem Diazaborin nur eine Quote von maximal 26,8 %, wie aus Tabelle 5 auf Seite 24 ersichtlich wird.

Im Gegensatz zur guten Wirkung auf den F-Faktor konnte Acridin Orange nach HAHN (10) die Ap-, Sm- und Su-Determinanten von R-Faktoren bei E.coli R S 2-Stämmen überhaupt nicht eliminieren und die Km- und die Cm- Determinanten in nur 21 % bzw. 22 % der Fälle eliminieren, während das Diazaborin CG 3401 immerhin die Ap- und Tc-Determinanten von R 1767 bei E.coli W 3110 in 54,1 % bzw. 65,6 % der Fälle eliminierte. Auch HAHN (10) berichtete über eine Abhängigkeit der Eliminierungsrate von der verwendeten Wirksubstanz. So ging die Gentamycin-Determinante des R-Faktor-tragenden Klebsiella pneumnoniae 3694-Stammes durch die Behandlung mit Ethidium Bromid in 57 %, durch Quinacrin und Acridin Orange in 34 % bzw. 20 % der Fälle verloren, während sie durch die Behandlung mit Chloroquin, Quinin, Spermin, p-Rosanilin und Methylen-Blau unbeeinflußt blieb (0 %).

5. Auch die Konzentration der Wirksubstanz spielt in Bezug auf ihren Eliminierungserfolg eine bedeutende Rolle. Bereits 1961 hatten WATANABE und FUKASAWA (28, 29) festgestellt, daß die Eliminierung mit zunehmender Konzentration von Acriflavin und Acridin Orange besser gelang. Dies bestätigten die Beobachtungen von BOUANCHAUD, SCAVIZZI und CHABBERT (1), daß sowohl bei Staphylococcus aureus LA 78 als auch bei Shigella flexneri LA 56 R 22 die Anzahl der sensiblen Keime nach der Behandlung mit Ethidium Bromid in höher werdenden Konzentrationen anstieg.

HAHN und CIAK (10, 11), die die Eliminierungsraten von intercalierenden Substanzen, wie Ethidium Bromid, Quinacrin, Acridin Orange, Berberin, Spermin, Quinin, Chloroquin, p-Rosanilin, Miracil D und Methylen-Blau auf den F-Faktor von E.coli K 12 3876-Stämmen erarbeiteten, bestimmten für

jede dieser Substanzen diejenigen Konzentrationen, bei der 50 % der ausgetesteten Keime ihr Plasmid durch die Behandlung verloren hatten und nannten sie 50 % - Eliminierungsdosis (ED_{50}). HAHN (10) gelang es weiterhin, eine statistisch begründete Korrelation zwischen der Eliminierungspotenz der oben aufgeführten Substanzen und ihrer Fähigkeit, Methyl-Grün von seiner Komplexbildung mit der Plasmid-DNA zu verdrängen, aufzuweisen. Die Eliminierungspotenz definierte er dabei als eine Funktion der relativen DNA-Bindungs-Kapazität; sie war für diejenigen intercalierenden Substanzen am höchsten, die die Plasmid-DNA am stärksten durch eine Verdrängung des Methyl-Grüns binden und somit inaktivieren konnten. Im Vergleich zu HAHN (10) konnten in eigenen Versuchen sowohl bei F'lac$^+$ als auch bei den Ap- und Tc-Determinanten von R 1767 eine statistisch fundierte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Eliminierung und Diazaborin-Konzentration dargestellt werden.

6. Auch die Eliminierungsquoten von denselben R-Determinanten eines R-Faktors fielen bei den einzelnen Behandlungsversuchen sehr unterschiedlich aus, wie die Zahlenwerte aus Tabelle 9 auf Seite 33 veranschaulichen.
So schwankten beispielsweise die Eliminierungsraten von R 1767 durch 32 µg Diazaborin/ml bei der Ap-Determinanten zwischen 8,4 % und 97,9 % und bei der Tc-Determinanten zwischen 22,9 % und 95,9 %. Bei der Eliminierung von F'lac$^+$ durch die gleiche Diazaborin-Konzentration fielen die Unterschiede nicht so stark ins Gewicht; die Werte lagen etwa zwischen 4 % und 30 %, wie Tabelle 4 auf Seite 23 zeigt.
Die Ursache der Streubreite bei den einzelnen Eliminierungsversuchen ist unbekannt.

Vermutlich beruht sie auf methodischen Schwankungen von folgenden aufgeführten wichtigen Parametern, deren Bedeutung insbesondere von HAHN (10) und HIROTA (15) bei der Eliminierung von F- und R-Plasmiden durch Aminoakridine (siehe auch Einleitung, Seite 3) hervorgehoben wurden.

a) HIROTA (15) beschrieb 1960, daß der pH-Wert des Nährmediums einen Einfluß auf den Eliminierungseffekt besaß. Er fand heraus, daß man mit der jeweils gleichen Acridin Orange-Konzentration bei einem pH von 7,6 eine 100 %-ige Eliminierung, bei einem pH von 7,2 dagegen keinen Erfolg mit der Eliminierungsbehandlung von F'lac$^+$ hatte. Er postulierte daraufhin für die entsprechenden Versuche enge pH-Aktivitätsgrenzen, die in enger Relation zu den Dissoziationskonstanten der Aminoakridine stehen sollten.
TOMOEDA, INUZUKA, KUBO und NAKAMURA (27) entdeckten, daß die Eliminierung von F- und R-Faktoren bei E.coli-Stämmen durch Natrium-dodecyl-sulfat in einem pH-Bereich von 7,0 - 7,6 gut gelang, während sie bei einem pH von 6,5 bzw. 8,0 schlechter vonstatten ging.
Auch BOUANCHAUD, SCAVIZZI und CHABBERT (1) stellten eine pH-Abhängigkeit beim Eliminierungserfolg von Resistenz-Eigenschaften durch Ethidium Bromid fest. Sie beobachteten, daß das Bakterienwachstum unabhängig von der verwendeten Ethidium Bromid-Konzentration mit zunehmendem pH-Wert abnahm, und daß der Anteil der nach der Behandlung mit 2,6 /ug Ethidium Bromid/ml sensibel gewordenen Tochterzellen bei einem pH von 7,2 ein Maximum von 50 % hatte, während er bei niedrigerem und höherem pH-Wert absank.

b) In der Literatur werden auch Temperaturschwankungen als Ursache für die methodischen Unregelmäßigkeiten angesehen. HIROTA (15) beschrieb bereits im Jahre 1960 eine Abhängigkeit der Eliminierungsrate von F-Faktoren durch Aminoakridine von der Temperatur. Er erkannte, daß die Lebensfähigkeit der Zellen bei niedriger Temperatur (5 °C) mit und ohne Behandlung durch Acridin Orange zwar gleich war, daß aber die Eliminierungsfrequenz bei Kolonien, die bei 37 °C behandelt worden waren, höher lag als bei den Kolonien, die bei 5 °C inkubiert waren; sie lag im ersten Fall bei 82,7 %, im zweiten Fall dagegen nur bei 3,6 %. Vermutlich bewirkt eine physiologische Inkubationstemperatur von 37 °C ebenso wie ein organisches Wachstumsmedium mit verschiedenen definierten Aminosäuren nach dem Postulat von HIROTA (15, siehe auch Einleitung, Seite 3) ein ausreichendes bakterielles Wachstum, so daß eine große Anzahl von Plasmiden von der Wirksubstanz angegriffen und eliminiert werden kann. In den eigenen Versuchen können Temperaturschwankungen für die Streubreite bei meinen Eliminierungsergebnissen nicht verantwortlich gemacht werden, da die Inkubationstemperatur stets bei 37 °C lag (siehe auch 2.7 auf den Seiten 14 und 15).

c) Auch die unterschiedliche Dauer der Behandlung spielt im Hinblick auf den Eliminierungserfolg eine große Bedeutung, was HIROTA (15) durch seine Beobachtung, daß bei der Eliminierungsbehandlung von F-Plasmiden mit der Dauer der Acridin-Orange-Inkubation der Anteil der F'lac$^+$-Zellen ab- und die der F'lac$^-$-Tochterzellen zunahm. Er deutete dies als einen fortlaufenden Verdünnungsprozeß, bei dem durch eine längere Behandlung, die stets länger als 6 Stunden sein sollte, eine immer größere Anzahl von F'lac$^+$-Zellen von der Wirksubstanz angegriffen und in F'lac$^-$-Zellen umgewandelt werden konnten. TOMOEDA, INUZUKA, KUBO und NAKAMURA (27) hoben die Bedeutung der Inkubationsdauer für das Ausmaß der R- und F-Faktor-Eliminierung bei E.coli-Stämmen durch Natrium-dodecyl-sulfat hervor. Die Eliminierungsfrequenzen lagen mit 100 % am höchsten bei 72-stündiger,

mit 17,8 % der Fälle am niedrigsten bei 9-stündiger Behandlung. In meinen Versuchen hielt ich durch stetige Verwendung von Über-Nacht-Kulturen die Inkubationszeit ziemlich konstant auf 18 Stunden, um so die Behandlungsdauer der F- und R-Plasmid tragenden E.coli-Stämme durch das Diazaborin CG 3401 zu standardisieren (siehe auch 2.7 auf den Seiten 14 und 15).

d) Auch Schwankungen bei der anfänglichen Bakterieninokulation könnten die Streubreite bei meinen Eliminierungsergebnissen erklären.
Schon 1960 hatten HIROTA (15) bei der Eliminierung von F'lac$^+$ durch Aminoakridine und 1976 HAHN (10) bei der Eliminierung von R-Faktoren festgestellt, daß eine Keimeinsaat von weniger als 10^4 Zellen/ml Voraussetzung für eine ausreichend hohe Eliminierungsquote sei. TOMOEDA, INUZUKA, KUBO und NAKAMURA (27) zeigten 1967, daß der Verlust von Multiresistenzen auf E.coli-Stämmen durch Natrium-dodecyl-sulfat umgekehrt proportional zur Bakterieninokulation war. Die höchsten Eliminierungsraten erreichten sie bei einer Dichte von 10^3 Zellen/ml, die niedrigste bei 10^8 Zellen/ml. Durch eine geringe Keimeinsaat können viele Bakterienkolonien während ihrer Vermehrung in vielen Generationen von der Wirksubstanz angegriffen und ihre Plasmide somit eliminiert werden. Schwankungen der bakteriellen Inokulation lassen sich nicht ganz ausschalten, weil man nicht genau angeben kann, wieviele Keime sich im Ausgangsstadium befinden (ungefähr 10^4 Zellen/ml).

e) Die große Streubreite bei den Eliminierungsversuchen von F'lac$^+$ und R 1767 ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß wir den Wirkungsmechanismus des Diazaborins CG 3401 und damit die den Wirkungsmechanismus beeinflussenden Größen noch nicht kennen. Daher berücksichtigen wir bei den Versuchsbedingungen die entscheidenden Parameter vielleicht überhaupt nicht.

Durch die genaue Erarbeitung der optimalen Bedingungen für die Eliminierungsversuche nach dem Prinzip: 'größtmögliche Eliminierung von Plasmiden bei niedriger Schwankungsbreite zwischen den Experimenten und guter Reproduzierbarkeit der Versuche' kann man auch Hinweise auf den Mechanismus der Plasmid-Eliminierung erhalten, und erst über die Kenntnis dieser Mechanismen wird es möglich sein, neue Substanzen zu entwickeln, die Plasmide und damit auch Resistenzeigenschaften wirkungsvoll zu eliminieren vermögen und im Sinne von HAHN (10) als 'Breitspektruminhibitoren' Eingang in eine neue Ära der antibakteriellen Chemotherapie finden können. Die bisher gefundenen Substanzen erfüllen diese Forderungen nur teilweise, da sie nur ganz bestimmte Plasmide eliminieren können, zumal es gerade diejenigen Plasmide zu sein scheinen, die eine gewisse Tendenz zur Spontaneliminierung aufweisen und die damit wahrscheinlich einer Beeinflussung durch gewisse Wirksubstanzen zugänglicher sind als andere Plasmide. Vor allen Dingen sollten Plasmid-eliminierende Substanzen, wie zum Beispiel auch das Diazaborin CG 3401,größere Sicherheit und einen höheren Erfolg im Hinblick auf ihre eliminierende Wirkung gewährleisten; denn durch eine Eliminierungsrate von maximal 65,6 % bei einzelnen Determinanten eines R-Faktors können nur ganz spezifische Resistenzeigenschaften ausgeschaltet und ihre Ausbreitung kann in nicht ausreichendem Maße verhindert werden.

Aus diesem Grund ist es auch nicht möglich, die bisher getesteten Wirksubstanzen als 'Breitspektruminhibitor' zu charakterisieren. Eine Anwendung von F- und R-Faktor-eliminierenden Stoffen zur Therapie von Antibiotika- oder Chemotherapeutika-resistenten Infektionen erscheint demnach trotz einzelner Eliminierungserfolge durch das Diazaborin CG 3401 auch weiterhin mehr als fraglich.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob das Diazaborin CG 3401 Plasmide aus Bakterienzellen eliminieren kann.
Untersucht wurde die Eliminierung von F-Plasmiden (F'lac$^+$) und von den R-Plasmiden RA 1, R 100, R s-a und R 1767. Während RA 1, R 100 und R s-a nicht beeinflußt werden konnten, gelang die Eliminierung bei F'lac$^+$ und einem Teil der R-Determinanten von R 1767 in unterschiedlich hohem Prozentsatz (bis 26,8 % bei F'lac$^+$ und bis 65,6 % bei R 1767). Dabei ließ sich trotz einer großen Streubreite bei den einzelnen Versuchen eine statistisch fundierte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Eliminierung von F'lac$^+$ bzw. R 1767 und der Konzentration des Diazaborins CG 3401 nachweisen.

Die Ursache der Streubreite bei den einzelnen Eliminierungsversuchen ist durch methodische Schwankungen von Parametern, wie dem pH-Wert, der Temperatur, der Bakterieninokulation, der Dauer der Behandlung und dem unbekannten Wirkungsmechanismus des Diazaborins CG 3401 zu erklären.

Es konnte gezeigt werden, daß Plasmid-tragende Bakterien weniger empfindlich gegenüber diesem Diazaborin sind als Plasmid-lose Zellen.

Nach Angaben aus der Literatur und aufgrund von eigenen Versuchsergebnissen hängt die Plasmid-Eliminierung vom Plasmid-tragenden Wirtsorganismus, von den zu eliminierenden Plasmiden, den R-Determinanten, der verwendeten Wirksubstanz und deren Konzentrationen ab.

6. Literaturverzeichnis

1 BOUANCHAUD, D.H., SCAVIZZI, M.R., CHABBERT, Y.A.
'Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Enterobacteria and Staphylococci'
J. gen. Microbiol. 54: 417-425 (1969)

2 CAIRNS, J.
The Application of Radioantography to the Study of DNA-Viruses
Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology, 27: 311-318 (1962)

3 CHEMIE GRÜNENTHAL GMBH, Stolberg/Rheinland
Mitteilungen über das Diazaborin CG 3401: 1-3 (1976)

4 DULANEY, E.L., RUBY, C.L.
'The Effect of 9-(3-dimethylaminopropylidene) Fluorence HCL on Episomal-Directed Mating Systems'
Devs ind. Microbiol. 12: 243-248 (1971)

5 PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE EV.
Arbeitsgemeinschaft Resistenz
Empfindlichkeit klinischer Isolate einiger Enterobacteriacae sowie von Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus und Streptococcus faecalis gegenüber Chemotherapeutika
Ergebnisse einer überregionalen kooperativen Studie aus dem Jahre 1975
Infection, 6: 35-44 (1978)

6 FALKOW, S.
Infectious Multiple Drug Resistance
Verlag: Pion LTD, London (1975)

7 FALKOW, S., CITARELLA, R.V., WOHLHIETER, J.A., WATANABE, T.
The Molecular Nature of R-Factors
J. of Molecular Biology, 17: 102-116 (1966)

8 FRANKLIN/SNOW
Biochemistry of Antimicrobial Action
Verlag: Cox and Wyman LTD, Falkenham, Norfolk, 70-76 (1971)

9 HAHN, F.E.
'Distamycin A and Netropsin.
III. Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents'
Aus: Antibiotics, Springer-Verlag, Berlin, 79-100 (1975)

10 HAHN, F.E.
'Experimental Elimination of R-Factors'
Antibiotics and Chemotherapy
vol 20: 196-226 (1976)

11 HAHN, F.E., CIAK, J.
'Elimination of Bacterial Episomes by DNA-Complexing-Compounds
Ann. N.Y. Acad. Sci. 182: 295-304 (1971)

12 HAHN, F.E., CIAK, J.
'Elimination of Plasmidic Determinants by DNA-Complexing Compounds'
Topics in Infect. Diseases I
Verlag: Springer, New-York-Wien: 99 - 113 (1975)

13 HAHN, F.E., CIAK, J.
'Restoration of Drug-Resistent Bacteria to Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs'
Army Sci. Conf. vol. 2: 1-5 (1973)

14 HAYASHI, K., KODAIRA, T., OGAWA, Y. BABA, K., KIKUCHI, K.
'Studies on the Substances Affecting the Episomic Infective Transfer System'
I. The Relationsship between the Chemical Structures of Acridine Derivatives and the Inhibitory Action on the Multiple-Drug-Resistance Transfer
Jap. J. Bact. 20: 498-505 (1965)

15 HIROTA, Y.
'The Effect of Acridine Dyes on Mating Type in Escherichia Coli'
Proc. natn. Acad. Sci. USA 46: 57-64 (1960)

16 HIROTA, Y., ILJUMA, T.
'Acriflavine as an Effective Agent for Eliminating-F-Factor in Escherichia Coli K-12'
Nature, London, 180: 655-656 (1957)

17 JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A.
Medizinische Mikrobiologie
Verlag: Springer, Berlin
3. Auflage: 59-68 (1973)

18 JOHNSTON, J.H., RICHMOND, M.H.
'The Increased Rate of Loss of Penicillinase Plasmids from Staphylococcus Aureus in the Presence of Rifampicin'
J. gen. Microbiol. 60: 137-139 (1970)

19 LERMAN, L.
'Acridine Mutagens and DNA-Structure'
J. of Cellular and Comparative Physiology
64: 1-18, Suppl. 1 (1964)

20 LÖSER, R., BOQUET, P.L., RÖSCHENTHALER, R.
'Inhibition of R-Factor Transfer by Levallorphan'
Biochem. biophys. Res. Commun. 45: 204-211 (1971)

21 MITSUHASHI, S., HARADA, K., KAMEDA, M.
'Elimination of Transmissible Drugresistance by Treatment with Acriflavin'
Nature, London, 189: 947 (1961)

22 PINNEY, R.J., SMITH, J.T.
'Elimination of an R-Factor by Trimethoprin'
J. Pharm. Pharmac., 24: suppl. 126 P (1972)

23 RAAB, C., RÖSCHENTHALER, R.
'Inhibition of Adsorption and Replication of the RNA-Phage MS-2 in Escherichia Coli C 3000 by Levallorphan'
Biochem. biophys. Res. Commun. 41: 1429-1436 (1970)

24 SANFILIPPO, A.
'Activity of Distamycin A on the Transfer of Drug-Resistance in Gramnegative Clinical Isolates'
Ann. N.Y. Acad. Sci. 182: 322-328 (1971)

25 SHENDEROV, B.A.
'Effect of 5-Nitrofuran Derivatives on Transmission of Drug Refractoriness by Conjugation'
Zh. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 48: 77-81 (1971)

26 TAKAHASHI, S., OKANISHI, A., UTAHARA, R., NITTA, K.
MAEDA, K., UMEZAWA, H.
'Macarbomycin, a New Antibiotic Containing Phosphorus'
J. Antibiot., 23: 48-50 (1970)

27 TOMOEDA, M., INUZUKA, M., KUBO, N., NAKAMURA, S.
'Effective Elimination of Drug-Resistance and Sex-Factors in Escherichia Coli by Sodium Dodecyl Sulfate'
J. of Bacteriology, 95: 1078 - 1089 (1967)

28 WATANABE, T., FUKASAWA, T.
'Episome Mediated Transfer of Drug-Resistance in Enterobacteriaceae'
J. of Bacteriology, 81: 679 - 683 (1961)

29 WATANABE, T., FUKASAWA, T.
'Episome Mediated Transfer of Drug-Resistance in Enterobacteriaceae'
'II. Elimination of Resistance Factors With Acridine Dyes'
J. Bact. 81: 679 - 683 (1961)

30 WATANABE, T., FUKASAWA, T.
'Episomic Resistance Factors in Enterobacteriaceae'
'III. Elimination of Resistance Factors by Treatment With Acridine Dyes'
Med. Biol., Tokyo, 56: 71 - 74 (1960)

31 WATANABE, T., OGATA, Y., SUGARAWA, K., ODA, K.
'Increase of Flavomycin Sensitivity of Bacteria by R-Factors'
from: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance
First International Symposium INFECTIOUS ANTIBIOTIC RESISTANCE, Castle of Smolenice, Czechoslovakia 1971
Verlag: Springer, Berlin, 105 - 113 (1972)

32 WIEDEMANN, B.
'Die biologische Aktivität von Resistenzplasmiden'
Immunität und Infektion, 5: 223 - 230 (1974)

Lebenslauf

Name:	Reinhart Böffel
geboren:	21. August 1953 in Duisburg
Eltern:	Heinz Böffel und Elfriede Böffel, geb. Sagasser
Grundschule:	1960 - 1964 DuisburgSüd
Gymnasium:	1964 - 1972 Städtisches Neusprachliches Reinhard- und Max-Mannesmann-Gymnasium Duisburg-Süd
Reifeprüfung:	03. Juni 1972 am gleichen Gymnasium
Medizinstudium:	1973 - 1980 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Ärztliche Vorprüfung:	März 1976 in Bonn
Praktisches Jahr:	Mai 1979 - April 1980 Universitätskliniken Bonn-Venusberg
Ärztliche Prüfung:	21. April 1980 in Bonn

Bonn, Juni 1980

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann für die freundliche Überlassung des Themas, seine Beratung in theoretischen und praktischen Fragen der vorliegenden Arbeit und für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.
Außerdem danke ich allen Mitarbeitern dieses Institutes für ihre Anleitung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit.